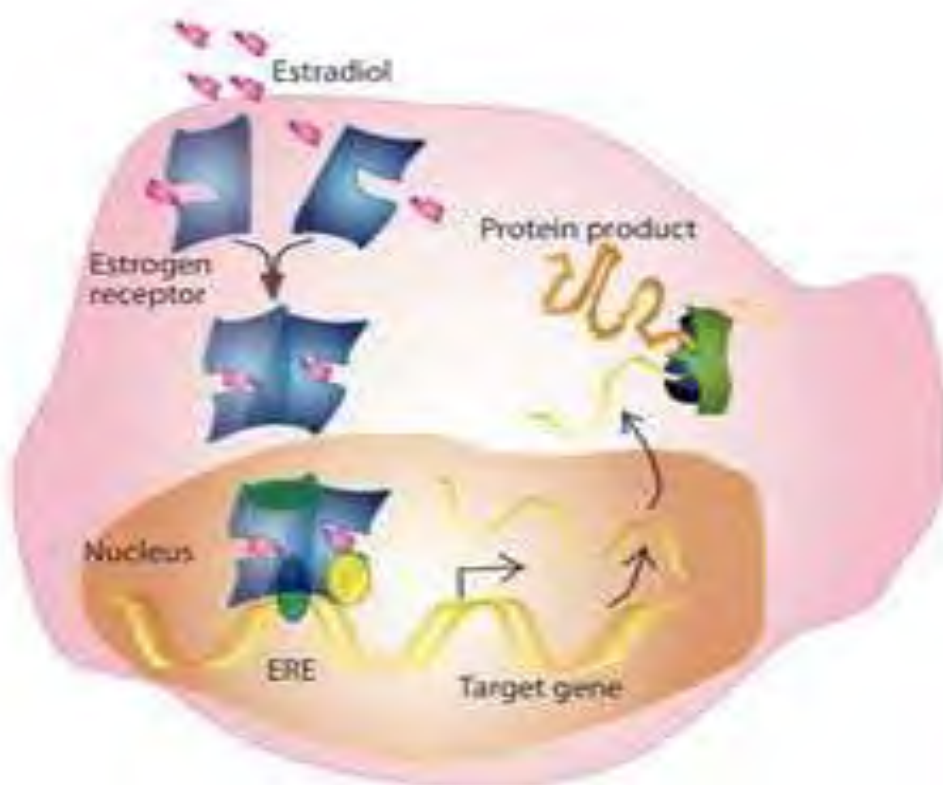


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της δράσης φλαβονοειδών στη δραστηριότητα των
υποδοχέων οιστρογόνων σε καρκινικά κύτταρα παχέος
εντέρου σε καλλιέργεια**



Επιμέλεια εργασίας: Μαλαματένια Παπαδοπούλου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Άννα-Μαρία Ψαρρά

ΛΑΡΙΣΑ 2012

**Μελέτη της δράσης φλαβονοειδών στη δραστικότητα των υποδοχέων
οιστρογόνων σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου σε καλλιέργεια**

Τριμελής Επιτροπή:

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Λέκτορας Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

Δήμας Κωνσταντίνος, Λέκτορας Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Π.Θ.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Λέκτορας Βιοχημείας TBB, Π.Θ.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την καθηγήτρια μου, κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και την κατανόησή της, τον κύριο Δημήτριο Λεωνίδα που μου επέτρεψε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερα την προπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Χαραλάμπους και τον απόφοιτο από το τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Μιχάλη Κωδούνη για τη βοήθειά τους καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας για την αρμονική συνεργασία.

Τέλος, ένα ευχαριστώ αξίζει η οικογένεια μου για την συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου προσφέρουν.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
1 ^ο ΜΕΡΟΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1 Φυσιολογία του ενδοκρινικού συστήματος.....	4
1.1.1 Σύνθεση, αποθήκευση και έκκριση ορμονών.....	5
1.1.2 Ρύθμιση έκκρισης ορμονών.....	7
1.1.3 Η συμμετοχή του υποθαλάμου και της υπόφυσης στα συστήματα ελέγχου της ορμονικής έκκρισης	8
1.1.4 Ορμονική δράση.....	10
1.2 Ορμόνες του φλοιού των επινεφριδίων.....	14
1.2.1 Στεροειδείς ορμόνες.....	15
1.2.2 Σύνθεση κορτικοστεροειδών ορμονών.....	15
1.2.3 Σύνθεση στεροειδών ορμονών του φύλου.....	16
1.2.4 Μεταβολισμός των στεροειδών ορμονών.....	19
1.3 Δράσεις οιστρογόνων.....	20
1.4 Τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους.....	21
1.4.1 Δομή των υποδοχέων των οιστρογόνων.....	21
1.4.2 Μηχανισμοί βιολογικής δράσης υποδοχέων οιστρογόνων.....	22
1.4.2.1 Πυρηνικοί υποδοχείς οιστρογόνων.....	22
1.4.2.2 Μιτοχονδριακοί υποδοχείς οιστρογόνων.....	23
1.4.3 Ο ρόλος των υποδοχέων των οιστρογόνων και άλλων μεταγραφικών παραγόντων στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.....	25
1.5 Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης.....	29
1.6 Οιστρογόνα και καρκίνος του παχέος εντέρου.....	31
1.7 Έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....	37
1.8 Φύση και δράση των φλαβονοειδών.....	40
1.8.1 Φύση φλαβονοειδών.....	40
1.8.2 Δράση φλαβονοειδών.....	47
2 ^ο ΜΕΡΟΣ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
2.1 ΥΛΙΚΑ.....	51
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53

2.2.1 Διαδικασίες για καλλιέργεια κυττάρων HCT116.....	53
2.2.2 Διαμόλυνση κυττάρων HCT116 με λιποφεκταμίνη.....	54
2.2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοζιδάσης.....	57
3ο ΜΕΡΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
3.1 Διερεύνηση της δράσης των υπό εξέταση φλαβονολών στη δραστηριότητα των ενδογενών υποδοχέων οιστρογόνων, ER σε κύτταρα HCT116.....	61
3.2 Διερεύνηση της δράσης των υπό εξέταση φλαβονολών στη δραστηριότητα των ενδογενών ER σε κύτταρα HCT116 υπό συνθήκες εξάλειψης αγωνιστών-ανταγωνιστών των ER από το υλικό ανάπτυξης τους.....	62
3.3 Διερεύνηση της δράσης των υπό εξέταση φλαβονολών στη δραστηριότητα του ERα κατόπιν υπερέκφρασης του σε κύτταρα HCT116.....	64
3.4 Διερεύνηση της δράσης της φλαβονόλης TAC στη δραστηριότητα του ERβ κατόπιν υπερέκφρασης του σε κύτταρα HCT116.....	65
3.5 Διερεύνηση της αντιοιστρογονικής δράσης της φλαβονόλης TAC σε κύτταρα HCT116.....	66
4ο ΜΕΡΟΣ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	68
5ο ΜΕΡΟΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

Περίληψη

Η κατανόηση των μηχανισμών δράσης των φλαβονοειδών στη δραστικότητα των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) (ισομορφές ERα και ERβ) σε τύπους καρκινικών κύτταρων αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας, δεδομένου του ρόλου των ER στη ρύθμιση βασικών βιολογικών διεργασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των δύο υποδοχέων στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ο οποίος εμφανίζει υψηλά ποσοστά θνησιμότητας παγκοσμίως, δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας δείχνουν υπο-έκφραση της βήτα μορφής του υποδοχέα κατά την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της οιστρογονικής ή αντιοιστρογονικής δράσης συγκεκριμένων φλαβονολών, καθώς επίσης και ο χαρακτηρισμός της πιθανής διαφορικής δράσης τους στους δύο τύπους υποδοχέων οιστρογόνων, υποδοχέας οιστρογόνων άλφα (ERα) και υποδοχέας οιστρογόνων βήτα (ERβ). Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε η δράση της οιστραδιόλης (E2) σε σύγκριση με τη δράση των φλαβονολών: της καμφερόλης, της κερκετίνης και του ακετυλιωμένου παραγώγου του 3-O-γλυκοζιδίου της καμφερόλης (TAC) στη δραστικότητα τόσο των ενδογενών ER, όσο και στη δραστικότητα εξωγενώς επαγόμενων υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ, σε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου (HCT116). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η TAC παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αναστολή στη δραστικότητα των ενδογενών υποδοχέων οιστρογόνων και μάλιστα μεγαλύτερη αυτής παρουσία καμφερόλης και κερκετίνης. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι η δράση της TAC φαίνεται να επιτελείται κυρίως μέσω της ERα μορφής του υποδοχέα. Πειράματα συναγωνιστικής αναστολής E2 και TAC αποδεικνύουν επίσης ότι η TAC ασκεί αντι-οιστρογονική δράση. Δεδομένου ότι η βήτα μορφή του υποδοχέα σχετίζεται με αντικαρκινική δράση, σε αντίθεση με τη ERα μορφή, τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν τη χρήση της TAC ως ένα εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο, με στοχευμένη δράση έναντι της ERα ισομορφής, για την περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

1ο ΜΕΡΟΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυσιολογία του ενδοκρινικού συστήματος

Το ενδοκρινικό σύστημα παίζει κεντρικό ρόλο στην προσαρμογή του ανθρώπινου οργανισμού στις μεταβολές του εσωτερικού και του εξωτερικού περιβάλλοντος. Το σύστημα αυτό δρα προκειμένου να διατηρείται σταθερό το εσωτερικό περιβάλλον έναντι των αλλαγών στην είσοδο και έξοδο ουσιών ανόργανων αλάτων, ύδατος, μορίων περιβάλλοντος, θερμότητας κ.λπ. Ειδικά ενδοκρινή κύτταρα, συνήθως ομαδοποιημένα σε αδένες, αντιλαμβάνονται τις διαταραχές και αποκρίνονται με έκκριση χημικών ουσιών στην κυκλοφορία του αίματος, οι οποίες καλούνται **ορμόνες**. Τα ειδικά αυτά μόρια μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στους διάφορους ιστούς, όπου προσάγουν μηνύματα και δρουν στα κύτταρα-στόχους τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα-στόχοι να αποκρίνονται κατά τρόπο αντίθετο από την κατεύθυνση της αλλαγής η οποία προκάλεσε την έκκριση της ορμόνης και, έτσι, επανέρχεται ο οργανισμός στην αρχική του κατάσταση. Εκτός από τον θεμελιώδη αυτό ρόλο της διατήρησης της **ομοιόστασης**, το ενδοκρινικό σύστημα συντελεί στην έναρξη, στη διεκπεραίωση και στη ρύθμιση των διεργασιών της αύξησης, ωρίμανσης, αναπαραγωγής και γήρανσης του οργανισμού.

Η ορμόνη αρχικά ορίσθηκε ως ουσία που παράγεται και εκκρίνεται από έναν τύπο κυττάρων και μεταφέρει μηνύματα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε απομακρυσμένα κύτταρα-στόχους. Ωστόσο, η πολύπλοκη αυτή μέθοδος αγωγής μηνυμάτων πιθανώς προήλθε από έναν αρχέγονο μηχανισμό. Τα μόρια της ορμόνης τα οποία εκκρίνονται από τα ενδοκρινή κύτταρα μπορούν επίσης να φθάσουν και να δράσουν πάνω στα κύτταρα-στόχους με απλή διάχυση στο διάμεσο υγρό που τα διαχωρίζει. Αυτό καλείται **παρακρινική λειτουργία**. Τα ορμονικά μόρια μπορούν επίσης να δρουν αντίθετα, επί των αρχικών κυττάρων από τα οποία προέρχονται, και να τροποποιούν την έκκριση τους ή άλλες ενδοκυττάρειες διεργασίες. Το φαινόμενο αυτό καλείται **αυτοκρινική λειτουργία**.

Το ενδοκρινικό σύστημα μπορεί να δρα ανεξάρτητα ή μπορεί να δρα σε συνεργασία με το νευρικό σύστημα, το οποίο είναι η άλλη κύρια συνιστώσα

της προσαρμοστικότητας του οργανισμού έναντι των αλλαγών. Μολονότι το ενδοκρινικό σύστημα αποκρίνεται περισσότερο σε χημικά ερεθίσματα και το νευρικό σύστημα περισσότερο σε φυσικά ή μηχανικά ερεθίσματα, υπάρχει αξιοσημείωτη αλληλοεπικάλυψη. Παραδείγματος χάριν, οι αλλαγές στη ποσότητα του φωτός και οι αλλαγές στη συγκέντρωση ουσιών του πλάσματος ίσως να προκαλούν αποκρίσεις και από τα δύο συστήματα. Η αλληλεπίδραση των δύο συστημάτων παίρνει διάφορες μορφές:

1. Ορισμένα ερεθίσματα που προκαλούν απελευθέρωση μιας ορμόνης γίνονται αντιληπτά πρώτα από το νευρικό σύστημα, το οποίο με τη σειρά του στέλνει μηνύματα στο κατάλληλο ενδοκρινές κύτταρο για να αποκριθεί.
2. Οι νευράξονες ορισμένων νευρώνων επεκτείνονται με τη μορφή δεσμίδων ή οδών μέχρι το τοίχωμα των τριχοειδών αγγείων. Το ερέθισμα προκαλεί απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών τους μέσα στη κυκλοφορία του αίματος. Ο υβριδικός αυτός τύπος διαβίβασης μηνυμάτων καλείται **νευροκρινική λειτουργία** και τα σηματοφόρα μόρια καλούνται νευροορμόνες.
3. Ορισμένα ερεθίσματα προκαλούν ολοκληρωμένες αποκρίσεις του ενδοκρινικού και του νευρικού συστήματος.

Με τον τρόπο αυτό τα δύο συστήματα αλληλοενισχύονται για την αποκατάσταση της ομοιόστασης.

1.1.1 Σύνθεση, αποθήκευση και έκκριση ορμονών

Οι ορμόνες συντίθενται, αποθηκεύονται και εκκρίνονται με διαφορετικούς τρόπους. Οι **πεπτιδικές** και οι **πρωτεϊνικές** ορμόνες συντίθενται με μια γενική διεργασία που χαρακτηρίζει τη σύνθεση όλων των εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Το γονίδιο ή το μόριο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), που κατευθύνει τη σύνθεση των ορμονών, μεταγράφει το αγγελιοφόρο μόριο ριβονουκλεϊκό οξύ (mRNA). Το τελευταίο διαπερνά το πυρηνικό περίβλημα, εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, όπου το μήνυμα του μεταφράζεται στα ριβοσώματα με τη συναρμογή των αμινοξέων στη σωστή αλληλουχία και τη δημιουργία ενός πρωταρχικού γονιδιακού προϊόντος. Αυτό είναι μεγαλύτερο

από την ίδια την ορμόνη και καλείται **προ-προορμόνη**. Στο **αμινο-τελικό** άκρο ένα σηματοδοτικό πεπτιδίο κατευθύνει τη μεταφορά της προορμόνης από το ριβόσωμα στο **ενδοπλασματικό δίκτυο**. Κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας, το σηματοδοτικό πεπτιδίο αποδομείται, απελευθερώνοντας την **προορμόνη**. Το μόριο περιέχει την ορμόνη καθώς και άλλες πεπτιδικές ακολουθίες.

Η προορμόνη μεταφέρεται στη συσκευή Golgi, όπου υφίσταται περαιτέρω διεργασίες, στις οποίες περιλαμβάνονται η διάσπαση, η προσθήκη των υδατανθρακικών μονάδων ή ο συνδυασμός διαφορετικών υπομονάδων που προέρχονται από διαφορετικά γονίδια. Στη συσκευή Golgi η ορμόνη και τα πεπτιδικά συμπαράγωγα τους συσκευάζονται μαζί σε ένα εκκριτικό κοκκίο.

Κατά τη διέγερση των ενδοκρινών κυττάρων, το περιεχόμενο των εκκριτικών κοκκίων απελευθερώνεται με τη διεργασία της εξωκυττάρωσης στο εξωκυττάριο υγρό και κατόπιν στα τριχοειδή αγγεία. Με τη συστολή των μικρονηματίων και υπό την καθοδήγηση των μικροσωληναρίων, τα εκκριτικά κοκκία κινούνται προς την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων και συντήκονται με αυτήν. Μια **πρωτεΐνη που δεσμεύει τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP)** υποβοηθεί στην πρόσδεση κοκκίων σε ειδικές θέσεις. Απαραίτητη προϋπόθεση για την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων είναι η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταροπλασματικού ασβεστίου (Ca^{++}). Τα Ca^{++} προέρχονται από το εξωκυττάριο υγρό και από ενδοκυττάρια αποθήκες που βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σε άλλα οργανίδια. Συχνά, της εξωκυττάρωσης προηγείται αύξηση της συγκέντρωσης της **κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP)**.

Οι **κατεχολαμινεργικές ορμόνες** (επινεφρίνη, νορεπινεφρίνη, ντοπαμίνη) συντίθενται από το αμινοξύ τυροσίνη μέσω μιας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων. Οι ορμόνες αυτές αποθηκεύονται σε εκκριτικά κοκκία και εκκρίνονται με τρόπο παρόμοιο με εκείνο των πεπτιδικών ορμονών.

Οι **θυρεοειδικές ορμόνες** (θυροξίνη, τριιωδοθυρονίνη) συντίθενται από τυροσίνη και ιώδιο με σειρά αντιδράσεων που συντελούνται, ενώ το αμινοξύ είναι ενσωματωμένο μέσω πεπτιδικών δεσμών σε ένα μεγάλο πρωτεϊνικό μόριο. Οι ορμόνες κατόπιν αποσπώνται από το πρωτεϊνικό μόριο για να αποθηκευθούν στα θυλάκια, τα οποία επενδύονται με ενδοκρινή κύτταρα. Η

έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών απαιτεί απομάκρυνση από τα θυλάκια και ενζυμική απελευθέρωση από την αποθηκευτική πρωτεΐνη.

Οι **στεροειδείς ορμόνες** (κορτιζόλη, αλδοστερόνη, ανδρογόνα, οιστρογόνα, προγεστίνες, βιταμίνη D) συντίθενται από χοληστερόλη με μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων. Ωστόσο, αυτές δεν αποθηκεύονται σε σημαντική ποσότητα μέσα στον αδένα προέλευσης. Έτσι, για να αυξηθεί η έκκριση των στεροειδών ορμονών, πρέπει να ενεργοποιηθεί ολόκληρη η βιοσυνθετική διεργασία εξαρχής από τη χοληστερόλη. Δηλαδή, στην πραγματικότητα, αποθηκευτική μορφή όλων των στεροειδών ορμονών είναι η ενδοκυττάρια αποθήκη χοληστερόλης.

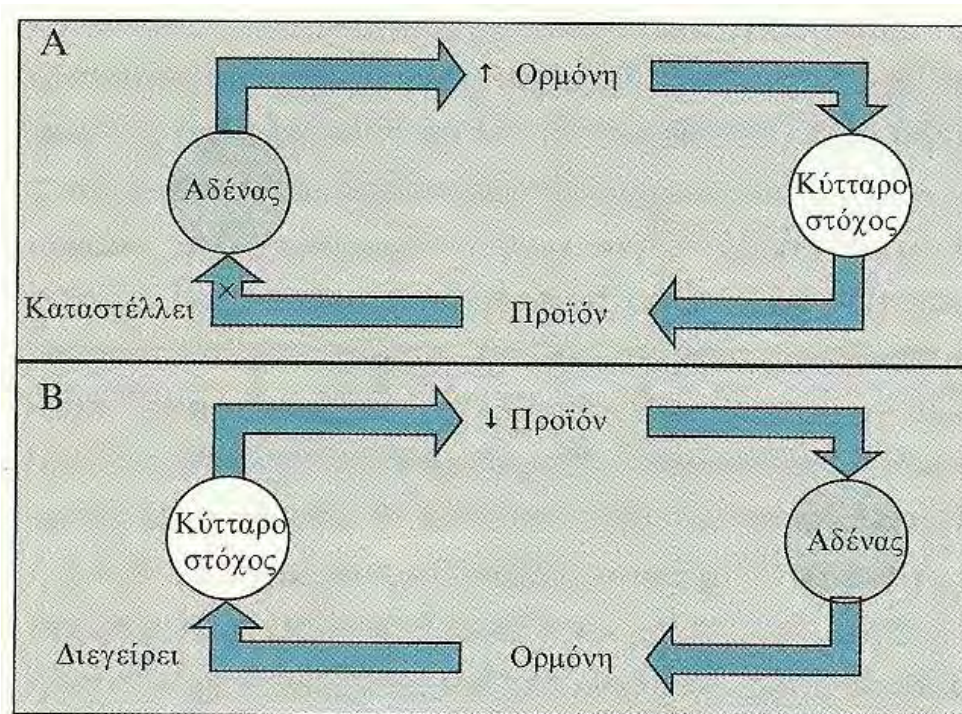
1.1.2 Ρύθμιση έκκρισης ορμονών

Η έκκριση των ορμονών σχετίζεται με τον ρόλο τους στη διατήρηση της ομοιόστασης. Ως εκ τούτου, κυρίαρχος μηχανισμός της ρύθμισης είναι η **αρνητική ανάδραση (Εικόνα 1)**. Εάν η ορμόνη A επιδρά στην αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος B στο πλάσμα, η ελάττωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος B διεγείρει την έκκριση της ορμόνης A, ενώ η αύξηση του υποστρώματος B καταστέλλει την έκκριση της ορμόνης A. Στην πραγματικότητα, οι φυσιολογικές συνθήκες που απαιτούν τη δράση μιας ορμόνης διεγείρουν και την έκκριση της. Οι συνθήκες ή τα τελικά προϊόντα που απορρέουν από προηγούμενη δράση της ορμόνης καταστέλλουν τη περαιτέρω έκκριση της. Η ομοιοστατική αυτή σχέση συνεργασίας μπορεί να υπάρχει μεταξύ μιας ορμόνης και ενός ή περισσότερων υποστρωμάτων, ανόργανων ουσιών, άλλων ορμονών ή ακόμη και φυσικών παραγόντων, όπως είναι ο όγκος υγρού.

Σπανίως παρατηρείται και ο μηχανισμός θετικής ανάδρασης. Σε τέτοιες περιπτώσεις ένα προϊόν της ορμονικής δράσης αρχικά διεγείρει την περαιτέρω έκκριση της ορμόνης. Όταν το προϊόν φθάσει τελικά στην κατάλληλη συγκέντρωση, μπορεί να προκαλέσει αρνητική ανάδραση στην έκκριση της ορμόνης. Ο μηχανισμός αυτός της ρύθμισης λειτουργεί όταν η βιολογική διεργασία αρχίζει από πολύ χαμηλά επίπεδα αλλά πρέπει να φθάσει σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της κανονικής φυσιολογικής λειτουργίας.

Η ρύθμιση μέσω του μηχανισμού της ανάδρασης είναι δυνατόν να ασκείται σε όλα τα επίπεδα της ενδοκρινικής λειτουργίας του κυττάρου – π.χ. στη μεταγραφή του γονιδίου της ορμόνης, στη μετάφραση του σήματος του γονιδίου της ορμόνης, και στην απελευθέρωση της αποθηκευμένης ορμόνης.

Σύμφωνα με τον ομοιοστατικό μηχανισμό ανάδρασης, υπάρχουν σχήματα ορμονικής απελευθέρωσης που υπαγορεύονται από ημερήσιους ή μικρότερης διάρκειας ρυθμούς, από τα στάδια του ύπνου, από τις εποχικές αλλαγές και από τα στάδια ανάπτυξης του οργανισμού (εμβρυϊκό, νεογνικό, εφηβεία, γήρας). Επίσης, ο πόνος, το συναίσθημα, ο φόβος, η σωματική βλάβη και η σεξουαλική διέγερση μπορούν να προκαλέσουν ή να διακόψουν την απελευθέρωση των ορμονών δια μέσου σύνθετων νευρικών οδών (Berne και Levy, 2000).



Εικόνα 1. Αρχή της αρνητικής ανάδρασης (Από Berne και Levy, 2000, Φυσιολογία, Τόμος II).

1.1.3 Η συμμετοχή του υποθαλάμου και της υπόφυσης στα συστήματα ελέγχου της ορμονικής έκκρισης

Εκτός από την αρχή της αρνητικής ανάδρασης, η έκκριση των ορμονών ελέγχεται στα ενδοκρινικά κύτταρα και μέσω της συγκέντρωσης των ιόντων

και θρεπτικών στοιχείων του πλάσματος, μέσω νεύρων και μέσω άλλων ορμονών. Συχνά, η έκκριση μιας συγκεκριμένης ορμόνης ελέγχεται απευθείας από την αιματική συγκέντρωση μιας άλλης ορμόνης. Έτσι προκύπτει μια σύνθετη αλληλουχία φαινομένων στην οποία η μοναδική λειτουργία των πρώτων ορμονών είναι η διέγερση έκκρισης των υπολοίπων ορμονών.

Η **υπόφυση** κείται μέσα σε ένα θύλακα κάτω ακριβώς από την εγκεφαλική περιοχή του **υποθαλάμου**. Η υπόφυση συνδέεται με τον υποθάλαμο μέσω χοανοειδούς δακτυλίου, που περιέχει νευρικές ίνες και αιμοφόρα αγγεία. Η υπόφυση αποτελείται από τον πρόσθιο λοβό και τον οπίσθιο λοβό. Η πρόσθια υπόφυση και το αντίστοιχο τμήμα του μίσχου της λέγεται και αδενοϋπόφυση, ενώ η οπίσθια υπόφυση και το αντίστοιχο τμήμα του μίσχου της λέγεται και νευροϋπόφυση.

Ακολουθείται η τρισχιδής ορμονική αλληλουχία για τον έλεγχο ορμονών στα ενδοκρινικά κύτταρα, η οποία είναι η εξής: (1) Μια εκκλυτική ορμόνη (ορμόνη που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο ή υποφυσιοτροπική) ελέγχει την έκκριση μιας ορμόνης της πρόσθιας υπόφυσης, (2) η οποία ελέγχει με τη σειρά της την έκκριση μιας άλλης ορμόνης (3) από κάποιον άλλον ενδοκρινή αδένα (**Εικόνα 2**). Η τελευταία αυτή ορμόνη δρα πάνω στα κύτταρα-στόχους. Παράδειγμα αυτής της ορμονικής αλληλουχίας αποτελεί και η γοναδοεκλυτίνη, GnRH (υποφυσιοτροπική ορμόνη), η οποία εκκρίνεται λόγω ερεθίσματος και προκαλεί την έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών (ορμονών πρόσθιας υπόφυσης), ωχρινοτροπίνη, LH και θυλακιοτροπίνη, FSH και τέλος εκκρίνονται στις γονάδες τα οιστρογόνα (οιστραδιόλη) και η προγεστερόνη στις γυναίκες, και η τεστοστερόνη στους άνδρες (A. Vander et al., 2001).



Εικόνα 2. Ορμονική αλληλουχία ελέγχου στα ενδοκρινή κύτταρα (Από A. Vander, D. Luciano, M. Τσακόπουλος, J. Sherman, (2001), Φυσιολογία του ανθρώπου Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού, Τόμος Ι).

1.1.4 Ορμονική δράση

Η πρόκληση ορμονικής απόκρισης συνεπάγεται τρία κύρια διαδοχικά στάδια:

1. Η ορμόνη πρέπει να αναγνωρισθεί από το κύτταρο στόχο της.
2. Κατόπιν πρέπει να δημιουργηθεί ένα δεύτερο ενδοκυττάριο σήμα.
3. Πρέπει να αυξηθούν ή να ελαττωθούν μία ή περισσότερες ενδοκυττάρειες διεργασίες (π.χ. ενζυμικές αντιδράσεις, μετακίνηση ιόντων, κυτταροσκελετική επαναδιάταξη, γονιδιακή μεταγραφή).

Αναγνώριση ορμονών: υποδοχείς

Η αναγνώριση γίνεται με δέσμευση της ορμόνης σε ειδικούς υποδοχείς, οι οποίοι εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα ή, πιθανώς, και σε άλλα οργανίδια των κυττάρων στόχων. Οι υποδοχείς έχουν ειδικές, μεγάλης συγγένειας, θέσεις δέσμευσης για την ορμόνη. Τα δύο μόρια συνδέονται με αντιστρεπτό τρόπο και σχηματίζουν το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα. Η αλληλεπίδραση της ορμόνης με τον υποδοχέα στα κύτταρα-στόχους εξαρτάται από την εξειδίκευση του υποδοχέα. Μόνο τα κύτταρα που έχουν υποδοχείς μπορούν να αποκρίνονται στην ορμόνη και μόνο οι ορμόνες για τις οποίες το κύτταρο έχει υποδοχείς μπορούν να δρουν σε αυτό το κύτταρο.

Οι υποδοχείς είναι μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια που είναι δυνατόν να περιέχουν υδατανθρακικές μονάδες. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ενσωματωμένοι στην κυτταρική μεμβράνη και έχουν ένα εξωκυττάριο τμήμα που δεσμεύει τις ορμόνες τους. Το διαμεμβρανικό και το ενδοκυττάριο μέρος αλληλεπιδρούν μέσω ενός σηματοδοτικού μηχανισμού, ο οποίος πυροδοτεί τις ενδοκυττάρειες δράσεις.

Τα μόρια των υποδοχέων συντίθενται συνεχώς, μετατοπίζονται σε θέσεις σύνδεσης με τα ορμονικά μόρια και αποδομούνται. Η διεργασία αυτή είναι δυνατόν να επηρεασθεί με τους αντίστοιχους ορμονικούς εταίρους τους. Μερικές ορμόνες ελαττώνουν ή «ρυθμίζουν μειώνοντας» τον αριθμό των υποδοχέων τους και με τον τρόπο αυτό αποτρέπουν την υπερβάλλουσα δράση της ορμόνης στο κύτταρο. Άλλες ορμόνες επιστρατεύουν τους υποδοχείς τους και, έτσι, ενισχύουν την ορμονική δράση στο κύτταρο.

Δημιουργία σήματος

Η δημιουργία σήματος είναι το επόμενο βήμα της ορμονικής δράσης. Όταν η σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα γίνεται μέσα στην κυτταρική μεμβράνη, το προκύπτον σύμπλοκο συζευγνύεται και με άλλες συνιστώσες της κυτταρικής μεμβράνης. Η δράση τους στοχεύει στη δημιουργία, μέσα στο κύτταρο, μιας ποικιλίας σηματοδοτικών μορίων ή «δεύτερων αγγελιοφόρων», οι οποίοι, στη συνέχεια, επηρεάζουν μεταβολικές και άλλες διεργασίες. Στις περιπτώσεις αυτές η σημαντική πληροφορία για την πυροδότηση της

απόκρισης του κυττάρου, στην ουσία, βρίσκεται στο μόριο του υποδοχέα. Η πληροφορία αυτή μεταδίδεται στο κυτταρόπλασμα όταν η ορμόνη δεσμεύεται και αλλάζει τη διαμόρφωση της εξωκυττάριας περιοχής του μεμβρανικού υποδοχέα. Η ορμόνη είναι, ουσιαστικά, εξωκυττάριο σήμα (Berne και Levy, 2000). Σ' αυτήν την περίπτωση, οι υποδοχείς που δρουν με την ορμόνη είναι οι **μεμβρανικοί**, οι οποίοι, κατά κανόνα, εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου. Γνωστές κατηγορίες μεμβρανικών υποδοχέων είναι οι εξής : α) οι υποδοχείς μεμβρανών που δρουν μέσω G-πρωτεϊνών, β) οι υποδοχείς μεμβρανών που έχουν δράση κινάσης πρωτεϊνών (π.χ. κινάση τυροσίνης) και γ) οι υποδοχείς μεμβρανών που είναι κανάλια ιόντων. Υπάρχουν όμως και οι υποδοχείς ορμονών οι οποίοι είναι διαλυτοί μέσα στο κύτταρο όπου δημιουργείται το σύμπλοκο υποδοχέα-ορμόνης. Οι **διαλυτοί** υποδοχείς υπάρχουν επειδή υπάρχουν ορμόνες που είναι υδρόφοβες ενώσεις και δεν χρειάζονται να έχουν τους υποδοχείς τους στην επιφάνεια του κυττάρου διαπερνώντας εύκολα την κυτταρική μεμβράνη. Τέτοιες ορμόνες είναι οι στεροειδείς ορμόνες (φυλετικές και φλοιοεπινεφριδιακές ορμόνες), καθώς και οι ορμόνες θυρεοειδούς αδένα, θυροξίνη και τριιωδοθυρονίνη. Ορισμένοι από αυτούς τους υποδοχείς εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα και αφού αλληλεπιδράσουν με την ορμόνη, μετακινούνται στον πυρήνα (όπως π.χ. οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών), ενώ άλλοι εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα ακόμα και απουσία της ορμόνης (όπως π.χ. οι υποδοχείς των οιστρογόνων) (Γεωργάτσος και Γιαννακούρου, 2005).

Αντίθετα, όταν η σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα γίνεται μέσα στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα, το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά, τελικά, με ειδικά μόρια DNA και μεταβάλλει τη γονιδιακή έκφραση. Εκεί, οι δεύτεροι αγγελιοφόροι μεταγράφουν τα μόρια RNA που κατευθύνουν τη σύνθεση του πρωτεϊνικού μορίου. Στις περιπτώσεις αυτές, η ουσιαστική πληροφορία για την πυροδότηση της απόκρισης του κυττάρου βρίσκεται στο ίδιο ορμονικό μόριο καθώς και στον υποδοχέα του. Και η ορμόνη είναι ένα ενδοκυττάριο σήμα.

Αποτελέσματα της ορμονικής δράσης

Το τελικό ποσοτικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της ορμόνης με τα κύτταρα-στόχους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται: η συγκέντρωση της ορμόνης, ο αριθμός των υποδοχέων, η διάρκεια έκθεσης στη δράση της ορμόνης, τα διαστήματα μεταξύ διαδοχικών εκθέσεων στη δράση της ορμόνης, οι ενδοκυτταρικές συνθήκες - όπως λ.χ. οι συγκεντρώσεις των ρυθμιστικών ενζύμων, οι συμπαράγοντες ή τα υποστρώματα - και οι συναγωνιστικές επιδράσεις των ανταγωνιστικών ή συνεργιστικών ορμονών. Οι ορμονικές δράσεις δεν είναι συνήθως φαινόμενα που ακολουθούν τον κανόνα «όλον ή ουδέν».

1.2 Ορμόνες του φλοιού των επινεφριδίων

Τα επινεφρίδια είναι πολυλειτουργικοί ενδοκρινικοί αδένες που εκκρίνουν ποικίλες ορμόνες. Οι εκκρινόμενες από αυτά ορμόνες ελέγχουν μια μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών, όπως είναι η ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος, ο ρυθμός ανακύκλησης των πρωτεϊνών, ο μεταβολισμός των λιπών, των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών, το ισοζύγιο του νατρίου, του καλίου και του ασβεστίου, η διαμόρφωση της απόκρισης των ιστών σε ένα τραυματισμό ή σε μια φλεγμονή και η επιβίωση έναντι του στρες.

Κάθε επινεφρίδιο είναι τοποθετημένο ακριβώς πάνω από το σύστοιχο νεφρό και το συνολικό βάρος και των δύο μαζί ανέρχεται στα 6 έως 10g. Καθένας από τους δύο αδένες είναι συνδυασμός δύο διαφορετικών οντοτήτων. Η εξωτερική ζώνη, ή **φλοιός**, αποτελεί το 80% έως 90% του συνολικού βάρους. Προέρχεται από το μεσόδερμα και είναι η πηγή των κορτικοστεροειδών ορμονών. Η εσωτερική ζώνη, ή **μυελός** αποτελεί το υπόλοιπο 10% έως 20%. Προέρχεται από τα νευροεξωδερματικά κύτταρα των συμπαθητικών γαγγλίων και είναι η πηγή των κατεχολαμινεργικών ορμονών. Μικρές ομάδες φλοιικών κυττάρων απαντούν και στον μυελό, όπως και τα κύτταρα που εκκρίνουν κατεχολαμίνες και διαπερνούν τον φλοιό. Επίσης, είναι δυνατόν να υπάρχουν παρακρινικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων. Ο ιστός των επινεφριδίων εμφανίζει έναν από τους υψηλότερους ρυθμούς αιματικής ροής ανά γραμμάριο ιστού. Το αρτηριακό αίμα εισέρχεται στην έξω επιφάνεια του φλοιού και διοχετεύεται στα τριχοειδή αγγεία και η φλεβική παροχέτευση γίνεται στον μυελό. Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα στις εσωτερικές περιοχές του φλοιού και τα κύτταρα του μυελού υφίστανται τις επιδράσεις μεγάλων συγκεντρώσεων στεροειδών ορμονών που προέρχονται από τις εξωτερικές περιοχές του φλοιού.

Η εξωτερική ζώνη του φλοιού, η **σπειροειδής ζώνη**, αποτελείται από μικρό αριθμό κυτταρικών στιβάδων. Η μέση ζώνη, η **στηλιδωτή ζώνη**, είναι η παχύτερη και αποτελείται από στηλιδωτά κύτταρα που μοιάζουν με χορδές. Η εσωτερική ζώνη, η **δικτυωτή ζώνη**, σχηματίζεται από δίκτυα αλληλοσυνδεόμενων κυττάρων. Τα τυπικά κύτταρα που εκκρίνουν στεροειδή είναι πλούσια σε λιποσταγονίδια και περιέχουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων σε κυστίδια στις μεμβράνες τους.

1.2.1 Στεροειδείς ορμόνες

Κύριες ορμόνες του φλοιού είναι: (1) το **γλυκοκορτικοειδές κορτιζόλη**, η οποία παίζει κρίσιμο ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, καθώς και στην προσαρμογή στο στρες, (2) το **αλατοκορτικοειδές αλδοστερόνη**, η οποία παίζει ζωτικό ρόλο στη διατήρηση του φυσιολογικού όγκου του εξωκυττάριου υγρού και των επιπέδων του καλίου και (3) **τα πρόδρομα φυλετικά στεροειδή**, τα οποία συμμετέχουν στη διατήρηση των δευτερευόντων φυλετικών χαρακτηριστικών.

1.2.2 Σύνθεση κορτικοστεροειδών ορμονών

Πρόδρομος όλων των ορμονών του φλοιού των επινεφρίδιων είναι η χοληστερόλη, η οποία προσλαμβάνεται από το πλάσμα με τη βοήθεια ενός ειδικού, για τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, μεμβρανικού υποδοχέα. Μετά τη μεταφορά μέσα στο κύτταρο, η χοληστερόλη εστεροποιείται κατά μέγα μέρος και εναποτίθεται σε κυστίδια μέσα στο κυτταρόπλασμα. Υπό βασικές συνθήκες, η χοληστερόλη που προσλαμβάνεται από το πλάσμα χρησιμοποιείται αμέσως για τη σύνθεση ορμονών. Ωστόσο, όταν διεγερθεί η παραγωγή ορμόνης, η εναποθηκευμένη χοληστερόλη κινητοποιείται αμέσως και μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια για το πρώτο στάδιο της σύνθεσης των κορτικοστεροειδών ορμονών.

Οι περισσότερες αντιδράσεις της σύνθεσης των κορτικοστεροειδών καταλύονται από τα **ένζυμα του κυτοχρώματος P-450**. Τα γονίδια που κατευθύνουν τη σύνθεση τους έχουν σημαντική ομοιότητα μεταξύ τους, αν και μπορεί να εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Το ίδιο ένζυμο P-450 μπορεί να καταλύει περισσότερες από μία αντιδράσεις, ανάλογα με τη θέση τους στον φλοιό και με τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τις υδροξυλιώσεις του στεροειδούς πυρήνα. Οι αντιδράσεις αυτές απαιτούν μοριακό οξυγόνο, NADPH, μία φλαβοπρωτεΐνη και μία πρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο και η οποία ονομάζεται **αδρενοξίνη**.

Κορτιζόλη και Αλδοστερόνη

Η σύνθεση της κορτιζόλης, του κυρίου γλυκοκορτικοειδούς του ανθρώπου, συντελείται στην στηλιδωτή ζώνη. Αρχική και καθοριστική για τον ρυθμό της σύνθεσης αντίδραση είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε **πρεγνενολόνη**. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το μιτοχονδριακό ένζυμο P-450 scc, το οποίο διασπά την πλάγια αλυσίδα (είναι γνωστό επίσης και ως 20,22-δεσμολάση). Η πρεγνενολόνη μετατρέπεται κατόπιν σε **προγεστερόνη**. Ακολουθούν υδροξυλιώσεις στις θέσεις 17 και 21. Οι αντιδράσεις αυτές συντελούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η παραγόμενη με τον τρόπο αυτό 11-δεοξυκορτιζόλη μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και υδροξυλιώνεται στη θέση 11, που είναι το τελευταίο και κρίσιμο στάδιο για την παραγωγή του γλυκοκορτικοειδούς μορίου.

Ούτε το τελικό προϊόν, η κορτιζόλη, ούτε οι πρόδρομες ουσίες εναποθηκεύονται στα φλοιοεπινεφριδιακά κύτταρα. Έτσι σε περιπτώσεις οξείας ανάγκης αυξημένων ποσοτήτων κορτιζόλης, απαιτείται η ταχεία ενεργοποίηση του αρχικού ρυθμιστικού σταδίου: η διάσπαση της πλάγιας αλυσίδας της χοληστερόλης.

Η σύνθεση της αλδοστερόνης, που είναι το κύριο αλατοκορτικοειδές, πραγματοποιείται αποκλειστικά στη σπειροειδή ζώνη. Οι αντιδράσεις μετάβασης από τη χοληστερόλη στην κορτικοστερόνη γίνονται όπως και στην στηλιδωτή ζώνη. Στο επόμενο στάδιο-κλειδί, η μεθυλική ομάδα στη θέση C18 της κορτικοστερόνης οξειδώνεται, για να παραγάγει αλδοστερόνη (από το ίδιο ή από παρόμοιο μιτοχονδριακό ένζυμο που καταλύει την 11-υδροξυλίωση). Η δεοξυκορτικοστερόνη και το 18-υδροξύ παράγωγό της είναι επίσης στεροειδή που έχουν αλατοκορτικοειδή δράση και συντίθενται σε μικρές ποσότητες στην στηλιδωτή ζώνη.

1.2.3 Σύνθεση στεροειδών ορμονών του φύλου

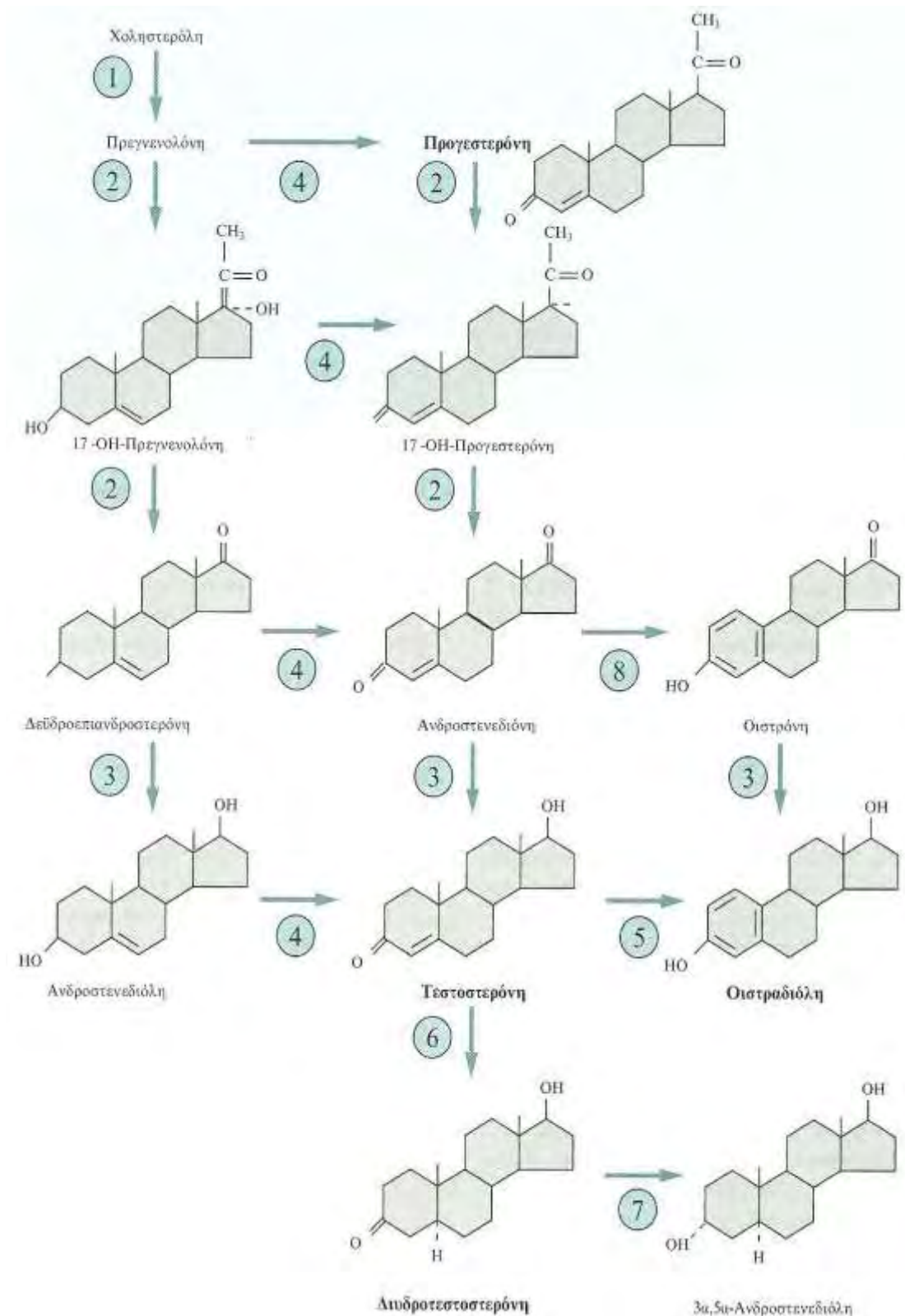
Οι πιο σημαντικές στεροειδείς ορμόνες είναι για το θήλυ η **οιστραδιόλη** και η **προγεστερόνη**, ενώ για το άρρεν η **τεστοστερόνη**.

Η σύνθεση των στεροειδών ορμονών του φύλου συντελείται κυρίως στη δικτυωτή ζώνη. Το ισχυρό ανδρογόνο, τεστοστερόνη, και το ισχυρό

οιστρογόνο, οιστραδιόλη, εκκρίνονται φυσιολογικά σε ελάχιστες ποσότητες από τον φλοιό των επινεφριδίων. Ωστόσο, σημαντικές ποσότητες από πρόδρομα στεροειδή με ασθενή ανδρογόνο δράση εκκρίνονται από τον φλοιό των επινεφριδίων και μετατρέπονται σε τεστοστερόνη και οιστραδιόλη στους περιφερικούς ιστούς. Αυτές οι πρόδρομες ουσίες, η **ανδροστενεδιόνη**, η **διυδροεπιανδροστερόνη** (DHEA-S), η **θειική-DHEA** (DHEA-S) από τη 17-OH-προγεστερόνη, αντίστοιχα.

Στις γυναίκες, οι επινεφριδιακές πρόδρομες ουσίες παρέχουν το 50% των απαιτούμενων ανδρογόνων ορμονών. Στους άνδρες δεν έχουν σημασία, διότι οι όρχεις παράγουν τεστοστερόνη. Μετά την εμμηνόπαυση, τα οιστρογόνα που άμεσα ή έμμεσα προέρχονται από τον φλοιό των επινεφριδίων είναι η μόνη πηγή γι' αυτήν τη βιολογική δραστηριότητα των γυναικών.

Η βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών των γονάδων ακολουθεί μια κοινή οδό και στα δύο φύλα (**Εικόνα 3**). Τα ένζυμα, η θέση τους στα οργάνια του κυττάρου και τα συνένζυμα που απαιτούνται είναι ίδια με εκείνα που έχουν περιγραφεί ως προς τον φλοιό των επινεφριδίων. Επίσης τα ένζυμα των γονάδων είναι ίδια με τα ένζυμα των επινεφριδίων και τα ίδια γονίδια κατευθύνουν τη σύνθεση τους. Η χοληστερόλη, που αποτελεί την αρχική ουσία, είτε συντίθεται *in situ* από το ακετυλοσυνένζυμο Α (ακετυλο-CoA) ή προσλαμβάνεται από τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) του πλάσματος. Η P-450 scc (20,22-δεσμολάση) καταλύει τη διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης και αποτελεί τον ρυθμό καθοριστικό στάδιο για τη σύνθεση της προγεστερόνης, των ανδρογόνων και των οιστρογόνων. Στους όρχεις, μια μικρή ποσότητα της τεστοστερόνης υφίσταται αναγωγή στη θέση 5α και μετατρέπεται σε **διυδροτεστοστερόνη** (DHT), η οποία είναι ένα ισχυρό ανδρογόνο. Ωστόσο, πολύ μεγαλύτερες ποσότητες τεστοστερόνης μετατρέπονται σε DHT στους ιστούς-στόχους από το ένζυμο 5α-αναγωγή. Η οιστραδιόλη και η οιστρόνη συντίθενται από τα αντίστοιχα πρόδρομα τους ανδρογόνα από το σύμπλοκο του ενζύμου αρωμάτωση P-450. Το σύμπλοκο αυτό καταλύει, τη μία μετά την άλλη, την υδροξυλίωση και την οξειδωση της μεθυλικής ομάδας στη θέση 19, τη δημιουργία διπλού δεσμού μεταξύ των θέσεων 1-2, την αποκαρβοξυλίωση της θέσης 19 και τη δημιουργία του χαρακτηριστικού βενζολικού δακτυλίου των οιστρογόνων.



Εικόνα 3. Οδοί σύνθεσης στεροειδών ορμονών στις γονάδες (Από Berne και Levy, 2000, Φυσιολογία, Τόμος II).

1.2.4 Μεταβολισμός των στεροειδών ορμονών

Τα βασικά επίπεδα της συγκέντρωσης κορτιζόλης πλάσματος, το πρωί κυμαίνονται από 5 έως 20μg/100mL, το απόγευμα, συχνά, πέφτουν κάτω από 5μg/100mL. Το 90% της ορμόνης κυκλοφορεί συνδεδεμένο με μια ειδική αλβουμίνη, που ονομάζεται **τρανσκορτίνη**. Η συγκέντρωση τρανσκορτίνης του πλάσματος καθώς και η ολική κορτιζόλη του πλάσματος αυξάνονται κατά την κύηση καθώς και μετά από χορήγηση οιστρογόνων. Ωστόσο, επειδή η συνδεδεμένη κορτιζόλη είναι βιολογικά αδρανής, οι φυσιολογικές επιδράσεις της αύξησης της τρανσκορτίνης υπολογίζονται σύμφωνα με τις αρχές που περιγράφηκαν ως προς τη θυροξίνη. Η ελεύθερη κορτιζόλη διηθείται από τους νεφρούς και, όταν η νεφρική λειτουργία είναι φυσιολογική, οι μικρές ποσότητες της ημερήσιας απέκκρισης κορτιζόλης από τα ούρα (10μg -100μg) είναι ένας ικανός δείκτης της έκκρισης κορτιζόλης.

Η κορτιζόλη βρίσκεται σε ισοζύγιο με το βιολογικά αδρανές 11-κετοανάλογο **κορτιζόνη**, μέσω του ενζύμου 11β-OH-δεϋδρογονάση. Το ένζυμο αυτό, που είναι παρόν σε πολλούς ιστούς, καθιστά την εξωγενή κορτιζόνη πραγματική πηγή δραστηριότητας. Η μετατροπή της κορτιζόλης σε κορτιζόνη στους νεφρούς παίζει σημαντικό ρόλο, εμποδίζοντας την κορτιζόλη να ασκεί αλατοκορτικοειδή δραστηριότητα συνδεδεμένη με τους υποδοχείς της αλδοστερόνης. Η κορτιζόλη και η κορτιζόνη μεταβολίζονται σχεδόν εξ' ολοκλήρου στο ήπαρ, οι μεταβολίτες συνδέονται και απεκκρίνονται στα ούρα ως γλυκουρονίδια. Η μέτρηση των περιεχομένων στα ούρα μεταβολιτών αυτών, που είναι γνωστοί ως **17-υδροξυκορτικοειδή**, παρέχει έναν δείκτη της έκκρισης κορτιζόλης, εφόσον η ηπατική και η νεφρική λειτουργία είναι φυσιολογική.

Η αλδοστερόνη κυκλοφορεί συνδεδεμένη με μια ειδική συνδετική αλβουμίνη, με την τρανσκορτίνη και με άλλες αλβουμίνες. Η αλδοστερόνη και οι παραγόμενοι στο ήπαρ μεταβολίτες της απεκκρίνονται στα ούρα ως γλυκουρονίδια.

Οι πρόδρομες ουσίες των ανδρογόνων μεταβολίζονται επίσης στο ήπαρ και απεκκρίνονται στα ούρα ως **17-κετοστεροειδή**. Ωστόσο, τα προϊόντα αυτά δεν είναι ειδικά για τον φλοιό των επινεφριδίων, διότι προέρχονται και από τα ανδρογόνα των γεννητικών αδένων.

1.3 Δράσεις οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη εισέρχονται ελεύθερα στα κύτταρα και συνδέονται με τους κυτταροπλασματικούς/πυρηνικούς υποδοχείς τους. Το σύμπλοκο φυλετικού στεροειδούς-υποδοχέα υφίσταται ενεργοποίηση, η οποία ενισχύει τη σύνδεση του με ειδικά μόρια DNA. Οι υποδοχείς μπορούν επίσης να φωσφορυλιωθούν από μια πρωτεϊνική κινάση που εξαρτάται από την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) και μπορεί να δημιουργήσει διμερή, αυξάνοντας έτσι την ικανότητα σύνδεσης τους. Διεγείροντας τη μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων, η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη αυξάνουν τη σύνθεση ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών οι οποίες έχουν αναπαραγωγικές λειτουργίες.

Επειδή συνήθως δεν υπάρχουν εφεδρικοί υποδοχείς, η αποκριτικότητα των διαφόρων ιστών στα στεροειδή της ωοθήκης είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση των υποδοχέων. Η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη μπορούν, με επιστράτευση υποδοχέων, να ενδυναμώσουν ή να αναστείλουν τις δράσεις της μιας από την άλλη. Η οιστραδιόλη αυξάνει στη μήτρα τους δικούς της υποδοχείς καθώς και τους υποδοχείς της προγεστερόνης, κατά το τελευταίο μέρος της παραγωγικής φάσης. Αντιθέτως, η προγεστερόνη ελαττώνει τους υποδοχείς της οιστραδιόλης και, επομένως, την επίδραση των οιστρογόνων στο ενδομήτριο κατά την εκκριτική φάση.

Η οιστραδιόλη και η οιστρόνη συνδέονται με τη δεσμευτική σφαιρίνη των στεροειδών του φύλου, αλλά η συγγένεια τους είναι μικρότερη από τη συγγένεια της τεστοστερόνης. Κυκλοφορούν συνδεδεμένες κατά μέγα μέρος με αλβουμίνη και αυτό το κλάσμα, μαζί με τα ελεύθερα στεροειδή, είναι τα βιολογικώς δραστικά κλάσματα. Στις γυναίκες που έχουν καταμήνιο κύκλο, το κύριο οιστρογόνο που κυκλοφορεί είναι η οιστραδιόλη που προέρχεται από τις ωοθήκες. Τα οιστρογόνα απεκκρίνονται στα ούρα, συνδεδεμένα με θειικό και γλυκουρονικό οξύ. Η προγεστερόνη κυκλοφορεί συνδεδεμένη κατά μέγα μέρος με αλβουμίνη. Ανάγεται σε πρεγνανοδιόλη και αποβάλλεται στα ούρα (Berne και Levy, 2000).

1.4. Τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους

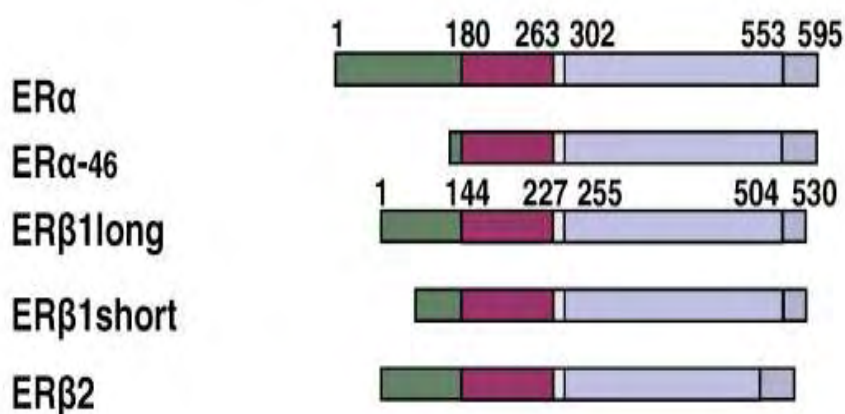
Οι υποδοχείς των οιστρογόνων είναι διαλυτοί υποδοχείς και κατανέμονται σε πυρηνικούς και σε μιτοχονδριακούς υποδοχείς. Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι υπάρχουν και μεμβρανικοί υποδοχείς οιστρογόνων (εντοπίστηκαν σε κυτταρική μεμβράνη).

1.4.1 Δομή των υποδοχέων των οιστρογόνων

Δύο κύριοι υποδοχείς έχουνδειχθεί, ο ERα και ο ERβ, οι οποίοι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (**Εικόνα 4**) (Psarra and Sekeris, 2008). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ERα, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6q25 του ανθρώπου και ο ERβ κωδικοποιείται από ένα γονίδιο στο χρωμόσωμα 14q23–24.1 (Kennelly et al., 2008). Και οι δύο είναι φυσιολογικά ενεργοί, παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή ιστού και διαφέρουν ως προς την ενεργοποίηση των γονιδίων τους. Το εναλλακτικό μάτισμα των γονιδίων των ERα και ERβ προκύπτει με έλλειψη εξονίων (Psarra and Sekeris, 2008). Όπως και σε άλλα μέλη του πυρήνα της υπεροικογένειας των υποδοχέων, οι υποδοχείς οιστρογόνων έχουν έξι λειτουργικές ικανότητες. Οι ERα και ERβ έχουν παρόμοιες περιοχές DNA-δέσμευσης και δέσμευσης προσδεμάτων, αλλά κατά τα άλλα, υπάρχει μικρή ομολογία. Ο ERβ έχει τουλάχιστον πέντε ισομορφές: τον υποδοχέα πλήρους μήκους που ονομάζεται ERβ1 ή (άγριος τύπος ERβ), και οι άλλες ισομορφές είναι αριθμημένες από 2–5 (Kennelly et al., 2008). Οι δύο βασικές ισομορφές του ERβ υποδοχέα, οι ERβ1 και ERβ2 υποδοχείς διαφέρουν ο ένας από τον άλλον εξαιτίας της εισαγωγής 54 ζευγών βάσεων ματισμένου εξονίου. Οι ERα και ERβ υποδοχείς συνδέονται με τα στοιχεία ανταπόκρισης οιστρογόνων (EREs), περιέχοντας είτε παλινδρομικές αλληλουχίες των TGACCT με έναν διαχωριστή 3 ζευγών βάσεων είτε τα μισά παλίνδρομα.

Μελέτες έχουν αποκαλύψει ποικιλία λειτουργιών για κάθε ER-υπότυπο. Με κάθε ER-υπότυπο, η trans-ενεργοποίηση σε ένα στοιχείο απόκρισης οιστρογόνων είναι παρόμοια μεταξύ των 17β-οιστραδιόλη και των αντι-οιστρογόνων ταμοξιφαίνη και ραλοξιφαίνη (Pace et al., 1997). Στην

ενεργοποίηση της πρωτεΐνης ενός στοιχείου απόκρισης, η 17β-οιστραδιόλη αυξάνει τη δραστηριότητα του ανταποκριτή με τον ERα, αλλά τον αναστέλλει με τον ERβ. Ωστόσο, με τα αντι-οιστρογόνα, η trans-ενεργοποίηση της πρωτεΐνης ενός στοιχείου απόκρισης μειώνεται με τον ERα και αυξάνεται με τον ERβ. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις καταλήγουν περαιτέρω στην ικανότητα των ER-υποτύπων να σχηματίσουν ομοδιμερή (α/α, β/β) ή ετεροδιμερή (α/β) και να οδηγήσουν σε ειδική έκφραση των συνενεργοποιητών και συγκαταστολέων του ER για κάθε κυτταρικό τύπο (Campbell-Thompson et al., 2001).



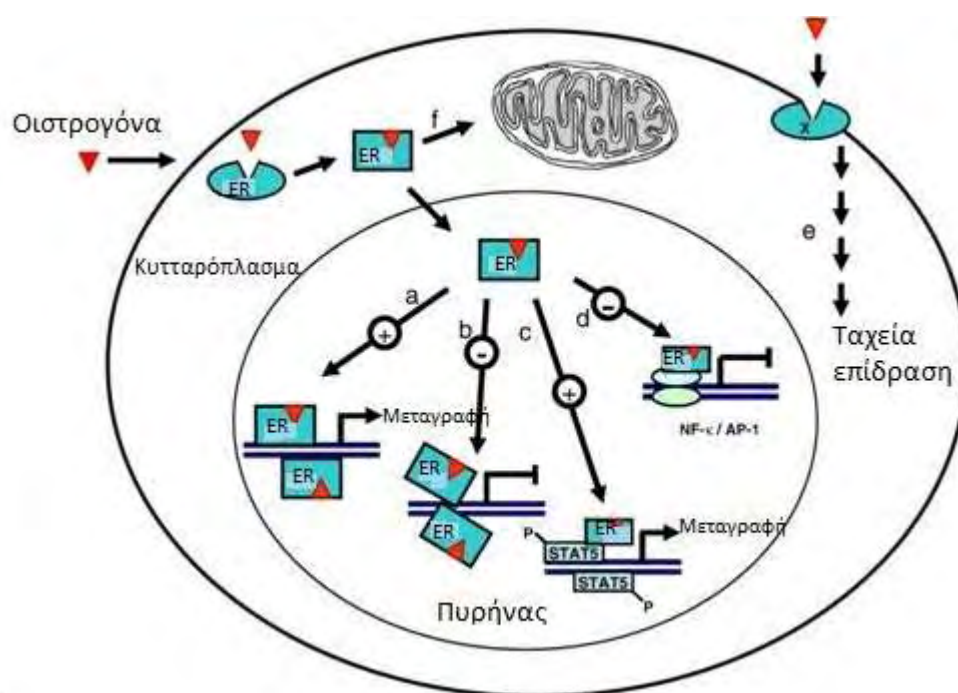
Εικόνα 4. Δομή των υποδοχέων των οιστρογόνων (Από Psarra et al., 2008, Life, 60(4):210-223).

1.4.2 Μηχανισμοί βιολογικής δράσης υποδοχέων οιστρογόνων

1.4.2.1 Πυρηνικοί υποδοχείς οιστρογόνων

Ως γνωστόν, τα οιστρογόνα επηρεάζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των ιστών-στόχων. Διαχέονται ελεύθερα από τον ορό μέσω της διπλοστιβάδας λιπιδίων στο ενδοκυττάριο περιβάλλον όπου οι πυρηνικοί υποδοχείς οιστρογόνων διατηρούνται σε ανενεργή κατάσταση μεταγραφής μέσα στο κύτταρο λόγω της αλληλεπίδρασης τους με τα μόρια συγκαταστολείς (**Εικόνα 5**). Η πρόσδεση των οιστρογόνων προκαλεί μια αλλαγή διαμόρφωσης που επιτρέπει την αποσύνδεση τους από τους

συγκатаστολείς και την πρόσληψη των συνενεργοποιητών μορίων. Αυτό το ενεργοποιημένο σύμπλοκο συνδέεται σε ένα στοιχείο ανταπόκρισης οιστρογόνων στο DNA-στόχο (ορμονοανταποκρινόμενες αλληλουχίες, HREs), το οποίο εκκινεί αυξανόμενη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Kennelly et al., 2008). Επίσης, τα οιστρογόνα ρυθμίζουν τη σεξουαλική ανάπτυξη και τις αναπαραγωγικές λειτουργίες εκτός από την λειτουργικότητα του καρδιαγγειακού, του κεντρικού νευρικού συστήματος και των οστών. Οι γονιδιωματικές δράσεις αυτών ενεργοποιούνται από τουλάχιστον δύο συνδεόμενα μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων στεροειδών, οι ERα και ERβ. Οι υποδοχείς οιστρογόνων, ERs λειτουργούν ως προσδέματα που ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση από αλληλεπιδράσεις με προαγωγούς-στοιχεία ανταπόκρισης ή άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Campbell-Thompson et al., 2001).



Εικόνα 5. Μηχανισμός δράσης υποδοχέων οιστρογόνων (ER) (Από Psarra et al., 2008, Science Direct, 1-11).

1.4.2.2 Μιτοχονδριακοί υποδοχείς οιστρογόνων

Οι υποδοχείς για τα οιστρογόνα έχουν εντοπιστεί και στα μιτοχόνδρια ποικίλων κυτταρικών τύπων με τις μεθόδους στυπώματος κατά Western,

σήμανσης ανοσοφθορισμού, συνεστιακής μικροσκοπίας και ηλεκτρονικής μικροσκοπησης. Ο ρόλος των υποδοχέων στη μιτοχονδριακή μεταγραφή, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και στην απόπτωση είναι πλέον γνωστός. Οι στεροειδείς ορμόνες ρυθμίζουν την παραγωγή ενέργειας, ελέγχοντας τη μεταγραφή πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους. Εκτός της δράσης των εντοπισμένων πυρηνικών υποδοχέων στην πυρηνική μεταγραφή γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, έχει καταδειχθεί και η παράλληλη δράση των μιτοχονδριακών γονιδίων στη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Η ενεργοποίηση του συντονισμού της μεταγραφής στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια από τους αντίστοιχους υποδοχείς είναι ιδιαίτερα αντιληπτή από τα κοινά trans στοιχεία δράσης στα δύο γονιδιώματα. Έχουν εξαχθεί πρόσφατα δεδομένα για τον ρόλο των μιτοχονδριακών υποδοχέων στην επιβίωση και στην απόπτωση κυττάρων από γονιδιωματικούς και μη γονιδιωματικούς μηχανισμούς. Η εντόπιση των υποδοχέων αυτών της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και άλλων μεταγραφικών παραγόντων στα μιτοχόνδρια αυξάνει την πηγή των ρυθμιστικών μορίων και περαιτέρω υπογραμμίζει τον κεντρικό ρόλο αυτών των οργανιδίων στην ολοκλήρωση και στην ενεργοποίηση της των μεταβολικών και κυτταρικών σημάτων επιβίωσης (Psarra and Sekeris, 2008).

Το μιτοχόνδριο είναι το μείζον κυτταρικό οργανίδιο παραγωγής ενέργειας και περιοχή βασικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένης και της απόπτωσης. Οι μιτοχονδριακές λειτουργίες παρουσιάζονται σε σύνδεση με άλλα κυτταρικά διαμερίσματα και ρυθμίζονται με διάφορα εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά σήματα. Διάφοροι πυρηνικοί υποδοχείς και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν την ανάπτυξη και πληθώρα μεταβολικών διεργασιών, έχουν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια. Αυτή η διαπίστωση φέρει το ερώτημα για τον ρόλο των ρυθμιστικών μορίων στο «νέο» τους περιβάλλον. Πειραματικά αποτελέσματα υποστηρίζουν τη δράση των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων στη μιτοχονδριακή μεταγραφή, στην ενεργειακή απόδοση και στην απόπτωση εκτείνοντας το γνωστό πυρηνικό ρόλο αυτών των μορίων έξω από το πυρήνα. Η αρχή του συντονισμού ενεργοποίησης της μεταγραφής των γονιδίων πυρήνα και μιτοχονδρίων έχει εξακριβωθεί ως ρυθμιστική δράση των στεροειδών ορμονών στην ενεργειακή απόδοση. Συνεπώς, οι ίδιοι

πυρηνικοί υποδοχείς που εντοπίστηκαν στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων παρουσιάζοντας κοινή λειτουργία μέσω αλληλεπίδρασης τους με ορμονοανταποκρινόμενες αλληλουχίες DNA (HREs) στα δύο γονιδιώματα (Psarra and Sekeris, 2008).

Οι πρώτες αναφορές της παρουσίας των υποδοχέων οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια βασίστηκαν στην κατανομή και στη σύνδεση ραδιενεργά σσημασμένων προσδεμάτων. Αργότερα, χρησιμοποιώντας ανοσοτεχνικές, ο ER εντοπίστηκε σε μιτοχόνδρια μήτρας και ωοθηκών κυττάρων αρουραίου, MCF-7 καρκινικών κυττάρων μαστού, καλλιεργημένων ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων, κυττάρων ιπποκάμπων και νευρικών κυττάρων αρουραίου. Επιπλέον, ο ER εντοπίστηκε σε μιτοχόνδρια κυττάρων μυοκαρδίου, ενδοθηλιακών κυττάρων, HepG2 κυττάρων ηπατοκαρκινώματος και SaOS-2 κυττάρων οστεοσαρκώματος, ανθρώπινων σπερματοκυττάρων και κυττάρων περιδοντικού συνδέσμου. Ωστόσο, σε μερικά μιτοχονδριακά κύτταρα έχουν παρουσιαστεί και οι ERα και ERβ υποδοχείς αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις ο ERβ είναι η κυρίαρχη ισομορφή του ER. Στα HepG2 και SaOS-2 κύτταρα, ο ERβ βρίσκεται μόνο στα μιτοχόνδρια ενώ ο ERα περιορίζεται στον πυρήνα εμπλουτισμένο στους πυρηνίσκους. Τα μοριακά βάρη των μιτοχονδριακών ERβ στα διάφορα κύτταρα και στους ιστούς κυμαίνονται μεταξύ 58 και 66KD αντανakλώντας πιθανώς την παρουσία διαφόρων ισομορφών υποδοχέων και την μετα-μεταφραστική τροποποίηση τους (Psarra and Sekeris, 2008).

1.4.3 Ο ρόλος των υποδοχέων των οιστρογόνων και άλλων μεταγραφικών παραγόντων στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων

Πυρηνικοί υποδοχείς στα μιτοχόνδρια και ο ρόλος τους στην απόπτωση

Ένας βασικός ρόλος των μιτοχονδρίων είναι να προμηθεύουν ATP στα κύτταρα μέσω του μεταβολισμού του οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Μη πλήρης αναγωγή O₂ οδηγεί σταθερά στη

παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου, τα οποία αποτελούν τους κύριους παράγοντες φυσικής κυτταρικής απόπτωσης.

Οι στεροειδείς ορμόνες είναι τα κύρια ρυθμιστικά σήματα της απόπτωσης, εισάγοντας ή αναστέλλοντας τις διαδικασίες που εξαρτώνται από τη φύση των κυττάρων-στόχων και των μιτοχονδρίων τους. Αυτά τα οργανίδια εμφανίζουν εξειδίκευση ιστού και τονίζεται ότι μόνο ένα υποσύνολο των πρωτεϊνών τους είναι κοινό με μιτοχόνδρια διαφορετικών κυτταρικών τύπων.

Τα οιστρογόνα είναι σημαντικά αντι-αποπτωτικά χημικά σήματα για πολλούς κυτταρικούς τύπους όπως καρκινικά κύτταρα μαστού, ενδοθηλιακά και εγκεφαλικά κύτταρα. Όπως είναι γνωστό, οι δράσεις των οιστρογόνων επιτελούνται μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους, τους ERα και ERβ. Μελέτες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος HepG2 και σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα MCF-7, έχουν δείξει ότι η χορήγηση 17-β-οιστραδιόλης οδηγεί στη μετακίνηση των δύο υποδοχέων οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια (Chen et al., 2004, Yang et al., 2004). Επιπλέον, η 17-β-οιστραδιόλη αυξάνει τα επίπεδα των κωδικοποιημένων μιτοχονδριακών mRNAs υπομονάδων I, II και III κυτοχρώματος οξειδασών και τις δραστηριότητες αναπνευστικών ενζύμων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μιτοχονδριακό DNA περιέχει αλληλουχίες παρόμοιες των πυρηνικών στοιχείων ανταπόκρισης οιστρογόνων (EREs) (Sekeris et al., In vivo, 1990). Επομένως, ο ρόλος των μιτοχονδριακών υποδοχέων οιστρογόνων στην απόπτωση συνίσταται στα αποτελέσματα προστασίας των οιστρογόνων και ενδέχεται να οφείλεται στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τους υποδοχείς οιστρογόνων (Psarra and Sekeris, 2008).

Πειραματικά αποτελέσματα υποστηρίζουν την αντιαποπτωτική δράση του μιτοχονδριακού υποδοχέα ERβ στη περίπτωση του μυοκαρδίου των αρουραίων που εκτίθενται σε τραύμα και αιμορραγία. Κάτω από τέτοιες συνθήκες, όπως η παρατεταμένη καταπόνηση των καρδιαγγειακών λειτουργιών, δηλαδή η μειωμένη καρδιακή απόδοση οδηγεί σε ελάττωση της ποσότητας του ERβ στα καρδιακά μιτοχόνδρια. Η 17-β-οιστραδιόλη και ο αγωνιστής ERβ-DNN αλλά όχι ο αγωνιστής του ERα-PTT, αποκαθιστούν την καρδιακή λειτουργία και την ποσότητα του ERβ στα μιτοχόνδρια. Διαδοχικά, η έκφραση των κυτοχρωμικών οξειδασών COX I και COXII, η δράση του αναπνευστικού συμπλόκου IV και η παραγωγή του ATP αυξάνουν τα

καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα της ορμόνης (Hsieh et al., 2006). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα οιστρογόνα δρουν προστατευτικά στα εγκεφαλικά αιμοφόρα αγγεία και σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων, υποστηρίζοντας την εμπλοκή των μιτοχονδριακών υποδοχέων οιστρογόνων (Duckles et al., 2006, Stirone et al., 2005, Lu et al., 2007). Άλλες μελέτες επικεντρώθηκαν στη ρύθμιση του καρδιακού ρυθμού, με εφαρμογή της γονιδιακής έκφρασης στην αορτή ποντικού και παρατηρήθηκε ότι ο ERα και ο ERβ ρυθμίζουν το ευδιάκριτο και μη επικαλυπτόμενο σύνολο των γονιδίων τους. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι ο ERβ είναι υπεύθυνος για τις επαγόμενες από οιστρογόνα ελαττώσεις στη γονιδιακή έκφραση (O'Lone et al., 2007). Μεταξύ των εξασθενημένων γονιδίων είναι και τα πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες των κυριότερων αναπνευστικών συμπλόκων, όπως αναμένεται από την άμεση δέσμευση του προαγωγέα αυτών των γονιδίων. Η μειορρύθμιση αυτών των γονιδίων στην επίδραση της αορτής είναι σε αντίθεση με τη διεγερτική επίδραση του ERβ σε άλλους κυτταρικούς τύπους και μπορεί να αντικατοπτρίζει τις βιολογικές επιπτώσεις των οιστρογόνων σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (Psarra and Sekeris, 2008).

Σε άλλα πειράματα, εφαρμόστηκε το πρότυπο σύστημα της ακτινοβολήσης UV των MCF-7 καρκινικών κυττάρων για να αξιολογηθεί ο ρόλος των υποδοχέων των οιστρογόνων στη κυτταρική επιβίωση (Pedram et al., 2006). Η μεταχείριση αυτή αυξάνει τη μιτοχονδριακή παραγωγή των δραστικών ειδών οξυγόνου και τη μετατόπιση του αντιαποπτωτικού παράγοντα Bax κρίσιμου μεσολαβητή του μιτοχονδριακού μονοπατιού για την απόπτωση στα μιτοχόνδρια (Yamaguchi et al., 2003). Η συνοδευόμενη, από ελάττωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος C καταλήγει στην απόπτωση. Αυτές οι επιπτώσεις αναστέλλονται από τα οιστρογόνα. Στη συνέχεια, καταδείχθηκε μια ευκρινής αντιαποπτωτική δράση και εμπλοκή των μιτοχονδριακών υποδοχέων οιστρογόνων με την επιμόλυνση καρκινικών κυττάρων μαστού προερχόμενα από HCC-1569 και CHO κύτταρα, αρνητικά σε υποδοχέα οιστρογόνων με την περιοχή δέσμευσης προσδέματος (E) οιστρογόνου του ER, σκοπούμενη είτε στον πυρήνα είτε στα μιτοχόνδρια (Psarra and Sekeris, 2007). Η σκόπευση της περιοχής του οιστρογόνου (E) στο πυρήνα δεν παρουσίασε προστασία στα

ακτινοβολημένα κύτταρα. Ωστόσο, στη σκοπούμενη περιοχή οιστρογόνου (E) στον υποδοχέα των μιτοχονδρίων προστατεύτηκαν τα κύτταρα από κυτταρικό θάνατο λόγω της ακτινοβολίας UV. Η δομή του υποδοχέα οιστρογόνων υστερούσε σε δέσμευση του DNA στη περιοχή του υποδοχέα. Συνεπώς, η αντιαποπτωτική του επίδραση δεν φαίνεται να μεσολαβεί της γονιδιωματικής δράσης (Psarra and Sekeris, 2008).

Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες στα μιτοχόνδρια και ο ρόλος τους στην απόπτωση

Εκτός από την οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, διάφοροι άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των πυρηνικών γονιδίων, συμπεριλαμβάνονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην ενδογενή ανοσία και στην απόπτωση. Συγκεκριμένα, οι NF-Kb, AP-1, CREB και p53 έχουν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια. Ένας από τους ρόλους αυτών των παραγόντων στη μιτοχονδριακή μεταγραφή και στον ενεργειακό μεταβολισμό σχετίζεται με την απόπτωση (Psarra and Sekeris, 2008).

1.5 Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης

Η πρόκληση καρκίνου από ένα ξеноβιοτικό (χημική ένωση που δεν παράγεται από έναν οργανισμό αλλά την προσλαμβάνει από το περιβάλλον στο οποίο ζει) είναι μια διαδικασία πολυσταδιακή και επηρεαζόμενη από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Οι όγκοι σχηματίζονται λόγω της ανεξέλεγκτης αύξησης των ιστών, δηλαδή στην απώλεια του ελέγχου διαίρεσης των κυττάρων. Ένα μοντέλο που χρησιμοποιείται είναι το πολυσταδιακό μοντέλο (**Εικόνα 6**) και περιλαμβάνει τρία στάδια.

Έναρξη

Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το στάδιο της έναρξης της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι η πρόκληση των μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο-προγεννήτορα. Κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα προκαλείται μετάλλαξη, πιθανότατα σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, γεννιέται ένα κύτταρο που έχει την ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης ή αλλιώς ένα κύτταρο, που κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι κανονικά θα έκανε.

Προαγωγή

Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το στάδιο της προαγωγής της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων κυττάρων μέσω παραγόντων που προάγουν τη μίτωση (προαγωγείς). Το στάδιο αυτό είναι αντιστρεπτό με την απόσυρση του μιτογόνου παράγοντα. Καθώς το αρχικά μεταλλαγμένο κύτταρο διαιρείται, όταν πλησιάζει στην κυτταρική διαίρεση που κανονικά θα πέθαινε π.χ. την 40^η και προχωρά στην 41^η, 42^η κ.λπ., προστίθενται γενωμικές βλάβες στα κύτταρα απογόνους οι οποίες δεν θα γίνονταν αφού τα κύτταρα θα πέθαιναν στην 40^η διαίρεση. Συνεπώς, από τα κύτταρα που προκύπτουν, ένα αποκτά μια κρίσιμη μετάλλαξη η οποία το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο.

Πρόοδος

Στο στάδιο της προόδου το μεταλλαγμένο και εξαρτώμενο από τον προαγωγέα κύτταρο μετατρέπεται σε ένα καρκινικό ανεξάρτητο κύτταρο. Κάτω από τη συνεχή μιτογόνο επίδραση του προαγωγέα κάποιο κύτταρο εμφανίζει επιπλέον γενετικές μεταλλάξεις, που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο. Τουλάχιστον δύο γενετικές βλάβες είναι απαραίτητες για την καρκινική εξαλλαγή και υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η δεύτερη βλάβη αφορά απάλειψη αντιογκογονιδίων. Συχνά, οι φάσεις προαγωγής/προόδου περιγράφονται σαν μια κοινή φάση που τελικά είναι πιο κοντά στη πραγματικότητα (Κουρέτας, 2003).



Εικόνα 6. Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης (Από Κουρέτα, Βιοχημική Τοξικολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2003).

1.6 Οιστρογόνα και καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο ρόλος των οιστρογόνων στην καρκινογένεση έχει εξεταστεί εκτενώς, ιδίως στον καρκίνο του μαστού, όπου οι ρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της στοχευμένης θεραπείας σε αυτή την ασθένεια. Ο ρόλος των οιστρογόνων στον καρκίνο του παχέος εντέρου δεν είναι πλήρως κατανοητός. Οι άνδρες με καρκίνο του παχέος εντέρου είναι πιο επιρρεπείς από ότι οι γυναίκες. Επιπλέον, η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης παρέχει πρόσθετη προστατευτική δράση για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, και όταν αυτές οι γυναίκες αναπτύσσουν καρκίνο, αυτός συνήθως είναι λιγότερο επιθετικός. Η ανακάλυψη ενός δεύτερου υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) δείχνει ότι εμπλέκεται λόγω της μειωμένης του έκφρασης σε καρκίνο του παχέος εντέρου καθώς πραγματοποιείται υπερέκφραση του υποδοχέα σε υγιές κόλον. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης του υποδοχέα παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος.

Επιδημιολογικά και επιστημονικά δεδομένα καθιστούν ενδιαφέρουσα τη μελέτη διερεύνησης του ρόλου των οιστρογόνων στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Οι επιδράσεις των οιστρογόνων φαίνεται να μεσολαβούν κυρίως μέσω του ERβ σε ένα συνδυασμό με γονιδιωματικούς και μη γονιδιωματικούς μηχανισμούς. Από τα ως τώρα δεδομένα, παρατηρείται ότι ο ERβ, εξαρτημένος ή ανεξάρτητος από την ενεργοποίηση της 17β-οιστραδιόλης, έχει έναν κρίσιμο ρόλο στην ομοιόσταση κυττάρων παχέος εντέρου, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η απουσία του ERβ, είτε μέσω αποκλεισμού ή γενετικού χειρισμού, καταλήγει σε αύξηση κυτταρικής ανανέωσης στο εντερικό βλεννογόνο. Η συνέπεια είναι ότι το σήμα του ERβ παρέχει προστασία έναντι της μιτογένεσης του παχέος εντέρου. Οι ρυθμιστές του ERβ μπορούν να αποτελέσουν φαρμακευτικά προϊόντα/εργαλεία για την πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου, αλλά οι διαφορές στο σήμα του ERβ θα περιπλέξουν την ανάπτυξη αυτών των θεραπειών.

Προστατευτικές γονιδιωματικές δράσεις των οιστρογόνων

Η έρευνα σχετικά με τη προστατευτική μεταγραφική δράση των οιστρογόνων έχει επικεντρωθεί σε δύο βασικά θέματα: την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την επαγωγή της απόπτωσης. Η μείωση της καρκινογένεσης ή της αφαίρεσης των καρκινικών όγκων που οφείλεται στα οιστρογόνα είναι ένα σταθερό εύρημα τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες όσο και σε ζωικά μοντέλα. Πολλοί μηχανισμοί μπορούν να εξηγήσουν αυτά τα αποτελέσματα.

Οι πολλαπλασιαστικές επιδράσεις των οιστρογόνων στις οποίες μεσολαβεί ο ERα μπορούν να διαμορφώνονται μέσω ενεργοποίησης του ERβ του μαστού, των ωοθηκών και του προστάτη. Η σημασία αυτών των ευρημάτων για το κόλον, όπου ο ERα εκφράζεται σε πολύ μικρές ποσότητες, είναι αμφισβητήσιμη. Η πιθανότητα να έχει ο ERβ αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα, η οποία είναι ανεξάρτητη της αναστολής του ERα εξετάστηκε σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού. Ποντίκια με βλαστική μετάλλαξη στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο για την αδενωματώδη πολυποδίαση είναι χρήσιμα για την μοντελοποίηση της εντερικής καρκινογένεσης. Συνήθως, περίπου 5% από αυτά τα ποντίκια αναπτύσσουν όγκους του παχέος εντέρου. Η ανεπάρκεια των υποδοχέων οιστρογόνων προκλήθηκε στο 63% των ποντικών και ανέπτυξαν τουλάχιστον έναν όγκο παχέος εντέρου. Η ιστολογική ανάλυση έδειξε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μειωμένη διαφοροποίηση του εντερικού βλεννογόνου. Επιπλέον, τα ποντίκια είχαν εγείρει κρυπτική σχάση, η οποία υποδεικνύει την εμπλοκή των οιστρογόνων στο συντονισμό στρωματικών-επιθηλιακών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες διατηρούν φυσιολογική κρυπτική αρχιτεκτονική του παχέος εντέρου.

Η υπερέκφραση του ERβ σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου 118 μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που σχετίζονται με την έκφραση της κυκλίνης E και του αναστολέα 1A της κινάσης που είναι εξαρτώμενη από κυκλίνη για το ένα πέμπτο των φυσιολογικών επιπέδων. Αυτά τα αποτελέσματα, ενώ εξαρτώνται από τον ERβ, ήταν αναπαραγώγιμα κατά την απουσία εξωγενούς E2 σε μέσο κυττάρων. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ενεργοποίηση του υποδοχέα οιστρογόνων

από άλλους αυξητικούς παράγοντες, όπως επιδερμικός αυξητικός παράγοντας και αυξητικός παράγοντας 1 ινσουλίνης .

Οι πολυαμίνες (πουτρεσκίνη, σπερμίνη) είναι μια ομάδα πολυκατιόντων που βρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά κύτταρα. Η σύνθεση αυτών εμφανίζεται στα πρώτα στάδια της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου. Μελέτες των φυτο-οιστρογόνων σε κυτταρικές σειρές DLD-1-καρκίνου του παχέος εντέρου έχουν δείξει ότι η βιοσύνθεση των πολυαμινών τους μειώθηκε από τα φυτο-οιστρογόνα, όπως η δραστηριότητα του ενζύμου αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης. Υψηλές συγκεντρώσεις αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης και πολυαμινών συνδέονται με ταχεία διαίρεση και κακοήθεια κύτταρων. Η σχέση μεταξύ της διατροφής και της πρόληψης του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι πλέον εξακριβωμένη. Οι φυτικές ίνες και τα προϊόντα σόγιας έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φυτο-οιστρογόνα και θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην προστατευτική δράση τους εναντίον του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Η επαγωγή της απόπτωσης από τον ERβ έχει περιγραφεί μέσω διάφορων μηχανισμών, όπως η αύξηση της κατάτμησης DNA στα COLO205 καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Ο μηχανισμός πίσω από αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στην πλειορρύθμιση της έκφρασης προ-αποπτωτικού γονιδίου Bax ή μιας μετατόπισης στην αναλογία των Bcl-2 σε Bax. Άλλοι ερευνητές σημειώνουν ότι ο ERβ επάγει την απόπτωση σε LoVo καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου λόγω της αύξησης του σήματος του παράγοντα p53 (με επακόλουθη πλειορρύθμιση της κασπάσης 8 και 9) και πρότειναν μείωση πρωτεϊνών β-κατενίνης ως αιτία αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η 17β-οιστραδιόλη με τον ERβ φαίνεται να ενεργοποιεί τη κασπάση 3, προκαλώντας έτσι προαποπτωτικές κλιμακωτές αντιδράσεις που εξαρτώνται από τη κασπάση. Ανεξάρτητα από τον ακριβή μηχανισμό, η προστασία των αποπτωτικών μηχανισμών οδηγεί σε διαταραχή της κυτταρικής διαίρεσης και τελικά της καρκινογένεσης.

Εναλλακτικοί τρόποι δράσης των οιστρογόνων στο εντερικό βλεννογόνο

Οι μη γονιδιωματικές δράσεις των στεροειδών περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση πολυάριθμων νευρικών κλιμακωτών αντιδράσεων, της φωσφολιπάσης C, της τριφωσφορικής ινοσιπόλης, του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, της κλιμακωτής αντίδρασης πρωτεϊνικής κινάσης και της εξωκυττάριας-κινάσης (ERK). Φαίνεται να υπάρχουν τόσα πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια και μηχανισμοί υποδοχέων, που η διαφοροποίηση της οιστρογονικής δράσης τους είναι πιθανό να εξαρτάται από το είδος, το φύλο, και τον εξειδικευμένο ιστό.

Αρχικά πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν τον υποδοχέα οιστρογόνων δεσμευμένο με μεμβράνη (μεμβρανικός υποδοχέας), με χρήση αντισωμάτων σε κυτταρικές σειρές καρκίνου στην υπόφυση αρουραίων (GH3/B6). Προτάθηκε ότι οι μεμβρανικοί υποδοχείς ήταν ο ίδιοι με τους κλασικούς πυρηνικούς υποδοχείς, λόγω της συνεντόπισης αντισωμάτων έναντι των υποδοχέων οιστρογόνων και τα οιστρογόνα βόειου ορού ως αντιγόνα, όμως τα πειράματα αυτά έγιναν πριν από την ανακάλυψη του ERβ. Ως εκ τούτου, ο υπολογισμός των ευρημάτων αυτών, που εκφράζουν αποκλειστικά τον ERβ στον ιστό του παχέος εντέρου, είναι δύσκολος (Pappas et al., 1995). Με τη χρήση των διαφόρων κυτταρικών σειρών, δόθηκαν περαιτέρω ενδείξεις για έναν μεμβρανικό υποδοχέα παρόμοιο με τους κλασικούς υποδοχείς οιστρογόνων, όμως, τα περισσότερα αποτελέσματα αφορούν τον ERα και έχουν περιορισμένη εφαρμογή στο κόλον. Όμως τα αποτελέσματα έδειξαν πλήρη απουσία των πυρηνικών υποδοχέων οιστρογόνων και των μεμβρανικών υποδοχέων οιστρογόνων καθώς και την αμελητέα δράση των υποδοχέων οιστρογόνων στα ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικών DERKO. Παρά το γεγονός ότι πολλά πρέπει ακόμη να διευκρινιστούν, τα αποδεικτικά στοιχεία για τον μεμβρανικό υποδοχέα οιστρογόνων δεν μπορούν να αποκλειστούν (Razandi et al., 2002, Pedram et al., 2006).

Η πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε κύτταρα DLD-1 και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου που εκφράζουν μόνο τον ERβ. Τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι όχι μόνο υπάρχει μεμβρανικός υποδοχέας οιστρογόνων, αλλά και ότι εξαρτάται από την παραγωγή παλμιτόυλο-CoA για

την στόχευση του στη μεμβράνη. Συνεπώς, η δράση του υποδοχέα αυτού μπορεί να ρυθμιστεί από τη διαφοροποίηση της διαδικασίας της παραγωγής παλμιτόϋλου-CoA (Fiorelli et al., 1999, Caiazza et al., 2007, Galluzzo et al., 2007). Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες διερεύνησης της δράσης των μεμβρανικών υποδοχέων των οιστρογόνων δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι είναι ο μοναδικός μηχανισμός για την ταχεία οιστρογονική δράση του στο παχύ έντερο (Razandi et al., 2004). Η συγκέντρωση του ERβ στα DLD-1 κύτταρα ήταν μικρή και η δράση του μειωνόταν όσο και περισσότερο από ό, τι σε παρόμοια μοντέλα που περιέχουν τον ERα.

Έχουν προταθεί διαφορετικά μοντέλα για την ταχεία οιστρογονική δράση ανεξάρτητα από τους γνωστούς υποδοχείς οιστρογόνων. Μια γρήγορη αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε θηλυκούς αρουραίους με καρκίνο παχέος εντέρου προκλήθηκε από τα οιστρογόνα, που διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες (λόγω σύζευξης BSA), με την παρουσία ενός ανταγωνιστή των υποδοχέων (ICI 182780) ο οποίος υποδηλώνει την παρουσία ενός μεμβρανικού υποδοχέα εκτός του ERβ (Doolan et al., 2003). Η πιθανότητα ότι αυτός ο υποδοχέας είναι δεσμευμένος με G-πρωτεΐνη διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας τους αναστολείς G-πρωτεϊνών, τη χολέρα και τις τοξίνες του κοκκύτη. Η τοξίνη της χολέρας κατήργησε όλες τις επιδράσεις που προκαλούνται από την 17β-οιστραδιόλη όχι όμως η τοξίνη του κοκκύτη, γεγονός που υποδηλώνει ότι ένας άγνωστος υποδοχέας με δέσμευση της G-πρωτεΐνης οδηγεί σε μη γονιδιωματική δράση της 17β-οιστραδιόλης. Με τη χρήση συγκεκριμένων ανταγωνιστών κινάσης, η πρωτεϊνική κινάση C βρέθηκε να είναι μεσολαβητής της δράσης των οιστρογόνων με πιο πιθανή τη δ ισομορφή τους (Doolan et al., 2000).

Μελέτες ανέφεραν την ενεργοποίηση της κλιμακωτής αντίδρασης της μιτογόνου ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής-κινάσης MAPK, της MAPK3 (ERK-1) και της MAPK1 (ERK-2), που είναι ανεξάρτητη από τους γνωστούς υποδοχείς των οιστρογόνων, αλλά εξαρτάται από συνδεδεμένο υποδοχέα με G-πρωτεΐνες (GPR-30) σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Οι GPR-30 είναι ευαίσθητες στην τοξίνη κοκκύτη, σε αντίθεση με τον συνδεδεμένο υποδοχέα με G-πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις μη-γονιδιωματικές δράσεις των οιστρογόνων στο παχύ έντερο (Filardo et al., 2000). Τα αποτελέσματα αυτά, ωστόσο, δεν ήταν πάντα αναπαραγώγιμα, έτσι για το αν οι GPR-30 είναι

ρυθμιστές της ταχείας δράσης της 17β-οιστραδιόλης στο κύτταρο, παραμένει άγνωστο (Vinacqua et al., 2006).

Μια ταχεία ροή ασβεστίου έχει αναπαραχθεί σε μια κυτταρική σειρά που δεν έχει υποδοχείς οιστρογόνων. Αυτή η ροή ασβεστίου προκαλεί έναρξη του σήματος MAPK-ERK σε καρκινικά κύτταρα μαστού, που είναι ανεξάρτητη του σήματος των υποδοχέων οιστρογόνων, θεωρώντας πιθανό η πρωτεϊνική κινάση C δ να είναι ένα εναλλακτικό μη γονιδιωματικό δραστικό μόριο. Συνεπώς, η δ ισομορφή της πρωτεϊνικής κινάσης C πιθανόν να προσδίδει ανθεκτικότητα στους εκλεκτικούς ρυθμιστές υποδοχέων οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού παρέχοντας ένα εναλλακτικό μιτογόνο μονοπάτι. Εάν αυτό ισχύει και για το παχύ έντερο, τότε εκλεκτικοί ανταγωνιστές της πρωτεϊνικής κινάσης C δ είναι πιθανοί παράγοντες για την πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Μη-γονιδιωματικές προστατευτικές δράσεις

Ενεργώντας μέσω του συνδεδεμένου μεμβρανικού υποδοχέα ERβ, η 17β οιστραδιόλη προκαλεί τη γρήγορη και επίμονη ενεργοποίηση του μονοπατιού του p38-MAPK στα κύτταρα DLD-1 καρκίνου του παχέος εντέρου, που οδηγούν σε προαποπτωτικές κλιμακωτές αντιδράσεις μέσω της κασπάσης 3. Μετά από περαιτέρω μελέτη των κυττάρων DLD-1, σημειώθηκε ότι η ενεργοποίηση του ERβ μέσω του μονοπατιού του p38-MAPK οδηγεί στην αυξανόμενη έκφραση του ίδιου του ERβ και με γονιδιωματικό και με μη γονιδιωματικό τρόπο καταλήγοντας σε αύξηση της προστατευτικής δράσης του (Caiazza et al., 2007). Το σύμπλοκο 17β-οιστραδιόλη-ERβ πιθανώς παίζει έναν ρόλο στην πρόληψη της μεθυλίωσης του υποδοχέα της βιταμίνης-D, ενός γνωστού μεσολαβητή της αύξησης του καρκίνου παχέος εντέρου, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την τρέχουσα μεταγραφή. Μια άμεση αύξηση στην έκφραση του υποδοχέα της βιταμίνης D έχει περιγραφεί μέσω εξωκύτταριου σήματος των MAPK1 ή MAPK3 κατά ένα γρήγορο μη-γονιδιωματικό τρόπο μέσα σε κυτταρικές σειρές HT29 καρκίνου του παχέος εντέρου, το οποίο παρέχει άλλη μια πιθανή εξήγηση για την προστατευτική δράση του ERβ στο κόλον (Kennelly et al., 2008).

1.7 Έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες (Campbell-Thompson et al.,2001). Καθώς επίσης, αυτή η μορφή καρκίνου ανήκει και στις κύριες αιτίες θανάτου στις δυτικές χώρες και η συχνότητα εμφάνισης της στην Ασία είναι συνεχώς αυξανόμενη (Li et al., 2009). Προβλέπεται ότι περίπου 130.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου διαγιγνώσκονται και περίπου 50.000 άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από αυτόν τον τύπο καρκίνου. Τα ποσοστά θνησιμότητας για τον καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν μειωθεί τα τελευταία 20 χρόνια, εξαιτίας της έγκαιρης διάγνωσης του. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου περιλαμβάνει κληρονομικές και μη κληρονομικές μορφές. Τη συντριπτική πλειοψηφία αποτελούν σποραδικές περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου και τα ποσοστά ανάπτυξης του αυξάνουν λογαριθμικά μετά την ηλικία των 40. Η κληρονομική μορφή του καρκίνου αυτού περιλαμβάνει την οικογένεια της αδενωματώδους πολυποδίασης και την μορφή μη πολυποδίασης καρκίνου του παχέος εντέρου (HNPCC) .

Ο ανθρώπινος καρκίνος του παχέος εντέρου υπόκειται σε ένα μονοπάτι καρκινογένεσης πολλαπλών σταδίων, από αδενωματώδη πολυποδίαση στο καρκίνωμα. Μια σειρά γενετικών συμβάντων έχουν χαρακτηριστεί και περιλαμβάνουν μεταβολές στα " ογκοκατασταλτικά " γονίδια και στα γονίδια επιδεκτικότητας που κανονικά κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες, που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο εξέλιξης και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα γονίδια της αδενωματώδους πολυποδίασης και τα γονίδια επιδιόρθωσης κακόζευξης μεταβάλλονται νωρίς στη νεοπλασματική διαδικασία, είτε ως κληρονομικές ή σωματικές μεταλλάξεις. Πρόσθετες σωματικές μεταλλάξεις στη μετατροπή του υποδοχέα του παράγοντα ανάπτυξης β, του K-ras ογκογονιδίου και του παράγοντα p53 μπορούν να εμφανιστούν σε περαιτέρω εξέλιξη. Η πιθανότητα να αποκτήσει ένα κανονικό επιθηλιακό κύτταρο παχέος εντέρου σωματική γονιδιακή τροποποίηση είναι μικρή, αλλά το 50% του πληθυσμού στην ηλικία των 70 ετών αναπτύσσει ένα πολύποδα , οποίος αναμένεται κατά 5% να εξελιχθεί σε αδενοκαρκινώμα. Οι ασθενείς με HNPCC αναπτύσσουν πολύποδες, που πολλές φορές καταλήγουν σε καρκίνο λόγω

της ελαττωματικότητας των γονιδίων επιδιόρθωσης κακόζευξης του DNA καταλήγοντας σε αυξημένα ποσοστά μετάλλαξης.

Δεδομένης της υψηλής συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου του παχέος εντέρου στους ηλικιωμένους και των υψηλών ποσοστών θνησιμότητας σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, χρειάζονται νέες στρατηγικές πρόληψης. Μια πιθανή προστατευτική δράση των οιστρογόνων στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει προταθεί από πολυάριθμες επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες. Σε όλες τις ηλικίες, οι γυναίκες είναι λιγότερο πιθανό να αναπτύξουν καρκίνο του παχέος εντέρου από ότι οι άνδρες (Ries et al., 2000, DeCosse et al., 1993, Levi et al., 1991). Αρσενικά τρωκτικά έχουν μεγαλύτερα ποσοστά καρκινογένεσης σε σύγκριση με τα θηλυκά σε αρκετούς τύπους καρκίνου του παχέος εντέρου. Η προστατευτική δράση των γυναικείων ορμονών είναι επίσης εμφανής σε οικογενή HNPCC, επειδή ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου είναι σημαντικά χαμηλότερος στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες (30% έναντι 74%, αντίστοιχα) (Froggatt et al., 1999). Επίσης, τα προκαταρκτικά στοιχεία που έχουν αναφερθεί στο τύπο καρκίνου του παχέος εντέρου, συγκεκριμένα οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση στο ποντίκι, δείχνουν μειωμένους όγκους στις φυσιολογικές γυναίκες σε σύγκριση με γυναίκες που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή (Carothers et al., 1999).

Η θεραπεία υποκατάστασης οιστρογόνων, ERT (μόνη ή σε συνδυασμό με προγεστίνες) εκτιμάται ότι μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου κατά 30-40% στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση 30 μελετών, συμπεριλαμβανομένων περιπτώσεων ελέγχου ή ομάδων με 3 μετα-αναλύσεις, οι 23 μελέτες ανέφεραν θετικά αποτελέσματα, ενώ μόνο 1 μελέτη ανέφερε αρνητικές επιπτώσεις της θεραπείας (Crandall et al., 1999). Η πλειοψηφία των μελετών από το 1995 και μετά έδειξε προστατευτικές δράσεις που έτειναν να ελέγχουν περισσότερες συγχυτικές μεταβλητές όπως χρήση ασπιρίνης ή κάπνισμα. Η μείωση του κινδύνου ήταν γενικά παρόμοια μεταξύ αυτών που είχαν υποβληθεί πρόσφατα σε θεραπεία ERT και αυτών που είχαν υποβληθεί σε παραπάνω από 5 χρόνια. Επίσης, αναφέρθηκε η προστατευτική δράση της ERT σχετικά με τις επιπτώσεις και το μέγεθος των πολυπόδων (Chen et al., 1998). Μερικοί ερευνητές αποδίδουν την μεγαλύτερη πτώση στα ποσοστά θνησιμότητας λόγω του καρκίνου του παχέος εντέρου σε ηλικιωμένες γυναίκες σε σύγκριση με άνδρες που έχουν

υποβληθεί σε θεραπεία ERT από το 1990 (Hebert-Croteau et al., 1998 Franceschi et al., 1998).

1.8 Φύση και δράση των Φλαβονοειδών

Τα Φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις, πολλές από τις οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα των καρπών και των ανθέων, είναι πολύ διαδεδομένες στα φυτά και συνιστούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής.

Περίπου 3.000 ενώσεις, ίσως και περισσότερος αριθμός, είναι γνωστές και απαντούν στα ανώτερα φυτά. Στις λειχήνες και στο ζωικό βασίλειο δεν έχουν βρεθεί φλαβονοειδή μέχρι σήμερα εκτός από μερικά φλαβονοειδή που βρέθηκαν στα φτερά μιας πεταλούδας. Επίσης, δεν απαντούν στα φύκη και τους μύκητες, αν και υπάρχει μια αναφορά για μια φλαβόνη που απαντά στα φύκη του γένους *Nitella* και ενός άλλου που βρέθηκε στο μύκητα *Aspergillus candidus*.

Στα φυτά απαντούν είτε με τη μορφή άγλυκου ή σε μορφή γλυκοσιδών. Οι γλυκοσίδες είναι Ο-γλυκοσίδες και μικρός αριθμός είναι C-γλυκοσίδες. Επειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση συνιστούν μέρος της διατροφής του ανθρώπου. Υπολογίζεται ότι ο άνθρωπος παίρνει με την τροφή του 1 gr ημερησίως (www.iama.gr).

Η πρώτη αναφορά σε βιολογική δράση των φλαβονοειδών έγινε από τον Szent-Gyorgyi το 1938, που ανέφερε ότι τα φλαβονοειδή του φλοιού των κίτρων εμποδίζουν την αιμορραγία και ευθραυστότητα των τριχοειδών αγγείων. Για αυτήν τη δράση, αποκαλούνται επίσης βιταμίνη P, αλλά η ύπαρξη αυτού του φαινομένου δεν έχει αποδειχθεί με βεβαιότητα. Από τότε πολλές φαρμακολογικές δράσεις έχουν αποδοθεί στα φλαβονοειδή, μεταξύ των οποίων αντιφλεγμονώδης, αντι-ηπατοτοξική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιιική, ανασταλτική σε ένζυμα, αντιοξειδωτική, και δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (www.pharmacy.upatras.gr).

1.8.1 Φύση Φλαβονοειδών

Κατηγορίες Φλαβονοειδών

Ανάλογα του βαθμού οξειδωσης του πυρανικού τους δακτυλίου διαιρούνται σε κατηγορίες:

1. Παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοπυριλίου: ανθοκυάνες

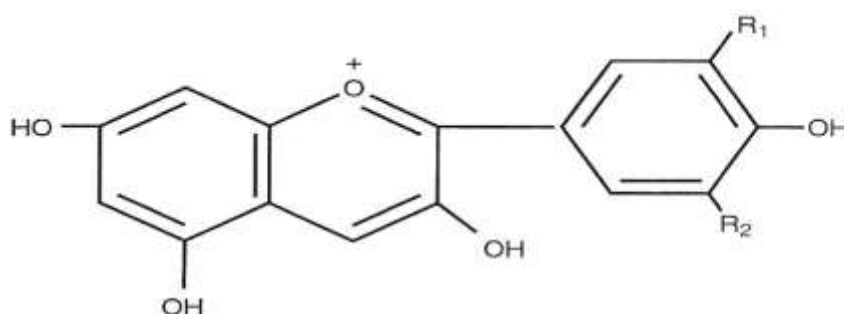
2. Παράγωγα της 2-φαιτυλοχρωμόνης: φλαβόνες, φλαβονόλες, και τα διμερή τους, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, ισοφλαβανόλες, ξανθόνες
3. Παράγωγα της 2-φαιτυλοχρωμανόνης: Φλαβάνες, φλαβαν-3-όλες, φλαβαν-3,4-διόλες, χαλκόνες, διϋδροχαλκόνες, κατεχίνες
4. Παράγωγα της βενζυλιδενοκουμαρόνης: αουρόνες

Ανθοκυάνες

Η ονομασία ανθοκυάνη αρχικώς χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τις ενώσεις που ήταν υπεύθυνες για το χρώμα των ανθέων του αραβοσίτου. Αργότερα εφαρμόσθηκε σε ενώσεις που ήταν διαλυτές στο νερό και το χρώμα τους ήταν κόκκινο, μωβ, μπλε, βιολετί στους καρπούς και τα άνθη. Παράγονται από το κατιόν 2-φαιτυλοβενζοπυρίλιο, κοινός ως κατιόν φλαβίλιο.

Οι ανθοκυάνες απαντούν σε όλα τα αγγειόσπερμα εκτός από τα *Caryophyllaceae*. Και αυτές γενικώς χαρακτηρίζουν το χρώμα των ανθέων και των καρπών, έχουν βρεθεί επίσης σε βράκτια φύλλα, ακόμη και σε ρίζες.

Έχουν το γενικό τύπο, με OH στη θέση C-3.



$R_1=R_2=H$ =Πελαργονιδίνη

$R_1=OH, R_2=H$ =Κυανιδίνη

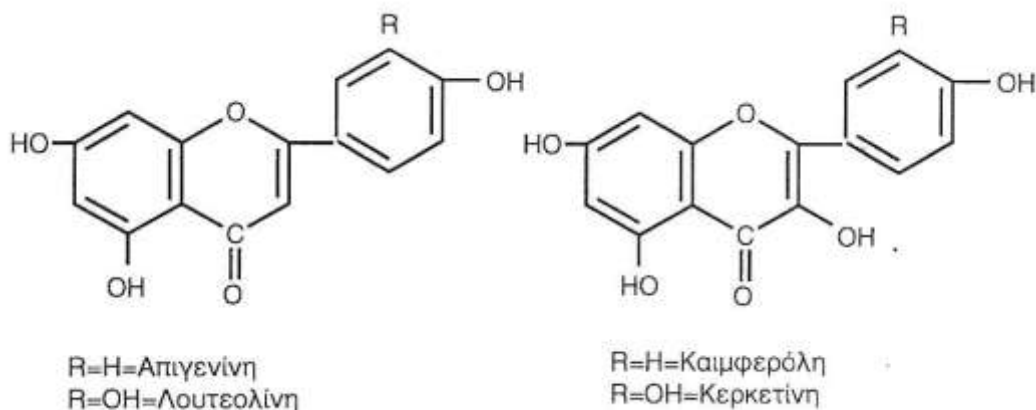
$R_1=R_2=OH$ = Δελφινίνη

Φλαβόνες - Φλαβονόλες

Ο όρος "flavone" προέρχεται από το λατινικό flavus=κίτρινο. Απαντούν είτε ως άγλυκα είτε σε μορφή γλυκοσιδών. Σπουδαιότερες είναι: απιγενίνη, λουτεολίνη και οι γλυκοσίδες τους.

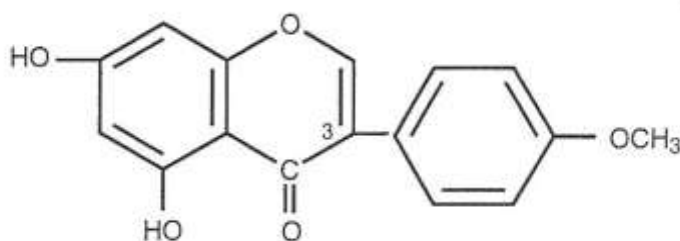
Οι φυσικές φλαβόνες είναι συνήθως ολιγοϋδροξυλιωμένα παράγωγα. Ο βαθμός υδροξυλίωσης κυμαίνεται από 0-7. Ο βαθμός υδροξυλίωσης μπορεί να έχει βιογενετική σημασία διότι σε χαμηλό βαθμό υδροξυλίωσης

επικρατούν οι φλαβόνες (3-θέση ελεύθερη), ενώ οι πολυϋδροξυλιωμένες συνήθως είναι φλαβονόλες (με OH στη θέση C-3). Σπουδαιότερες είναι: κερκετίνη, καιμφερόλη (καμφερόλη), μυρικετίνη, ισοραμνετίνη και οι γλυκοσίδες τους. Η ύπαρξη ή όχι OH στη θέση C-3 έχει σημαντική βιοσυνθετική, φυσιολογική, φαρμακολογική και αναλυτική σημασία.

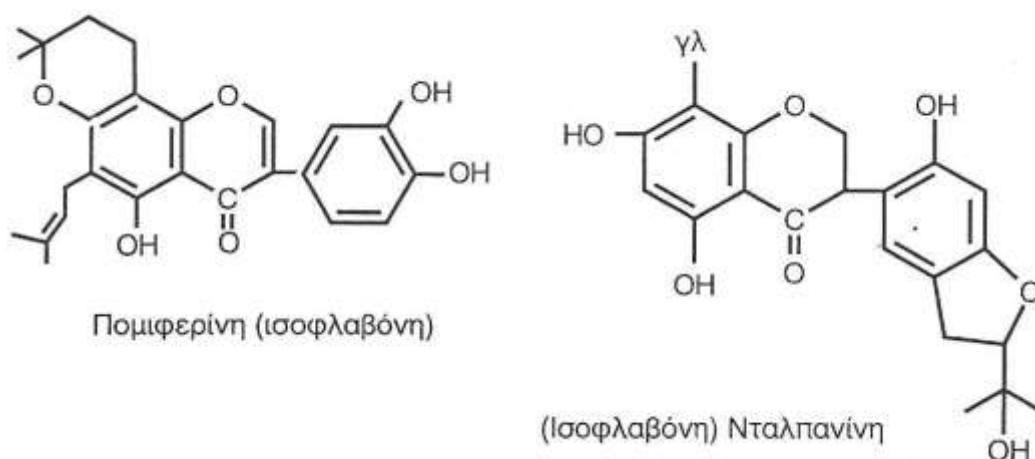


Ισοφλαβόνες – Ισοφλαβανόλες

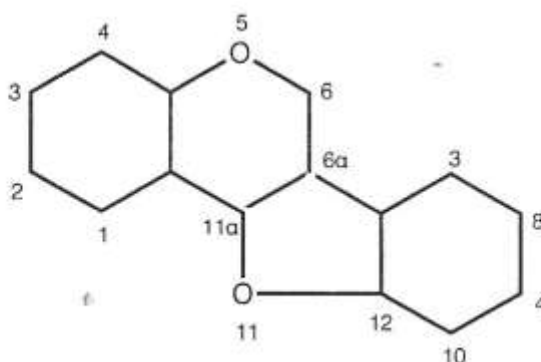
Οι ισοφλαβόνες διαφέρουν από τις άλλες τάξεις των φλαβονοειδών στο ότι είναι 3-φαινυλοχρωμόνες π.χ. η βιοχανίνη.



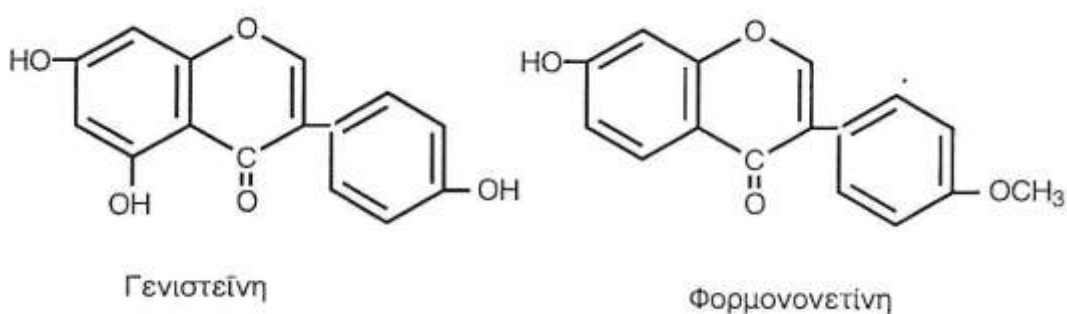
Είναι γνωστές περίπου 600 ενώσεις με σκελετό ισοφλαβόνης. Μπορούν να διαιρεθούν σε 12 τάξεις σύμφωνα με τα επίπεδα οξείδωσης και το είδος του δακτυλίου που μπορεί να είναι ενωμένος στο βασικό σκελετό της ισοφλαβόνης.



Οι πτεροκαρπάνες που έχουν τέσσερις δακτυλίους είναι μια από τις μεγαλύτερες τάξεις από τις ισοφλαβόνες και έχουν το γενικό τύπο:

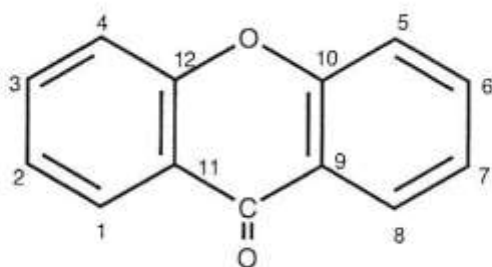


Οι ενώσεις αυτές έχουν έντονο αντιμυκητοκτόνο και αντιμικροβιακή δράση. Επίσης οι ισοφλαβόνες παρουσιάζουν μια σειρά από βιολογικές ιδιότητες. Όπως έδειξαν οι έρευνες, πρόβατα που βόσκουν σε λιβάδια που είναι πλούσια στο φυτό *Trifolium sulterraneum*, για μακρά περίοδο, παρουσιάζουν οιστρογονικές ιδιότητες. Δύο ισοφλαβόνες η γενιστεΐνη και φορμονονετίνη απομονώθηκαν από το ως άνω φυτό.

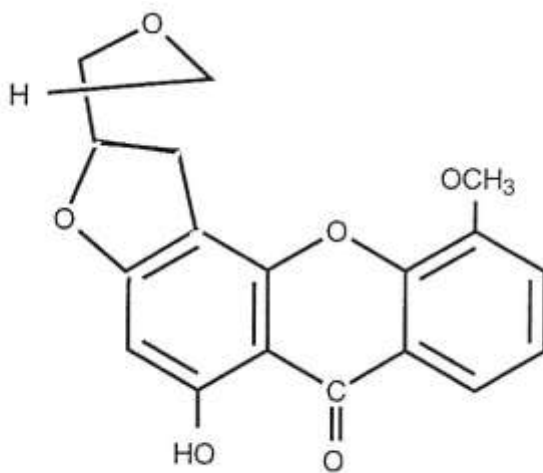


Ξανθόνες

Οι ενώσεις αυτές διαφέρουν των φλαβονών και φλαβονολών στο ότι ο φαινολικός δακτύλιος είναι ενωμένος με το βενζοπυράνιο στη θέση 9,10.

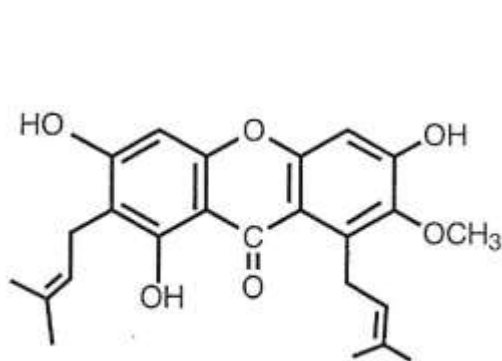


Απαντούν σε περιορισμένο αριθμό οικογενειών όπως στις Gentianaceae, Polygonaceae, Leguminosae, Phamnaceae. Βρέθηκαν επίσης στις πτέρες και σε μερικούς μύκητες. Οι ξανθόνες παρουσιάζουν κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Από το φυτό *Psorospermum tetrifugum* (Cruciferae), φυτό της τροπικής Αφρικής, απομονώθηκε η ξανθόνη ψωροσπερμίνη με αντιλευχαιμικές ιδιότητες in vivo στην P388 λεμφοκυτταρική λευχαιμία στα ποντίκια.

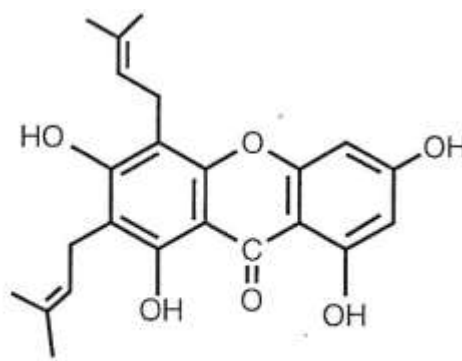


Ψωροσπερμίνη

Επίσης, βρέθηκαν διάφοροι μικροοργανισμοί που παράγουν ξανθόνες, με αντιμικροβιακή δράση. Παρόμοια δράση δείχνουν οι ξανθόνες που απομονώθηκαν από τα φυτά *Gareinia mangostana* και *Callorhynchum inophyllum* (Cruciferae).



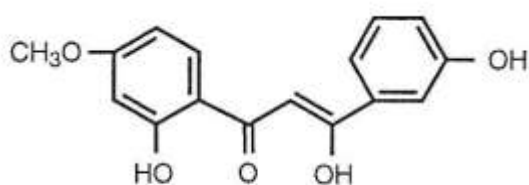
Μανγκαστίνη



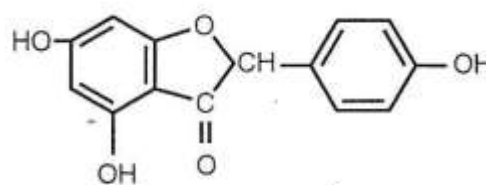
Γκαρτανίνη

Χαλκόνες, αουρόνες, διϋδροχαλκόνες

Είναι μικρές ομάδες χρωστικών, οι οποίες είναι κίτρινες και σε αλκαλικό περιβάλλον μετατρέπονται σε κόκκινες. Ο οικολογικός τους ρόλος στη φύση σε σχέση με το χρώμα των φυτών και κυρίως των ανθέων είναι σημαντικός. Οι διϋδροχαλκόνες είναι υδρογονωμένα παράγωγα των χαλκονών και είναι άχρωμες. Οι χαλκόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας γέφυρας με τρία άτομα άνθρακα με ένα ακόρεστο (α,β) δεσμό, οι δε αουρόνες από την παρουσία του δακτυλίου της βενζιλιδίνης. Απαντούν π.χ. στα *Prunus*, στο *Piper methysticum*, στο λυκίσκο και άλλα φυτά.



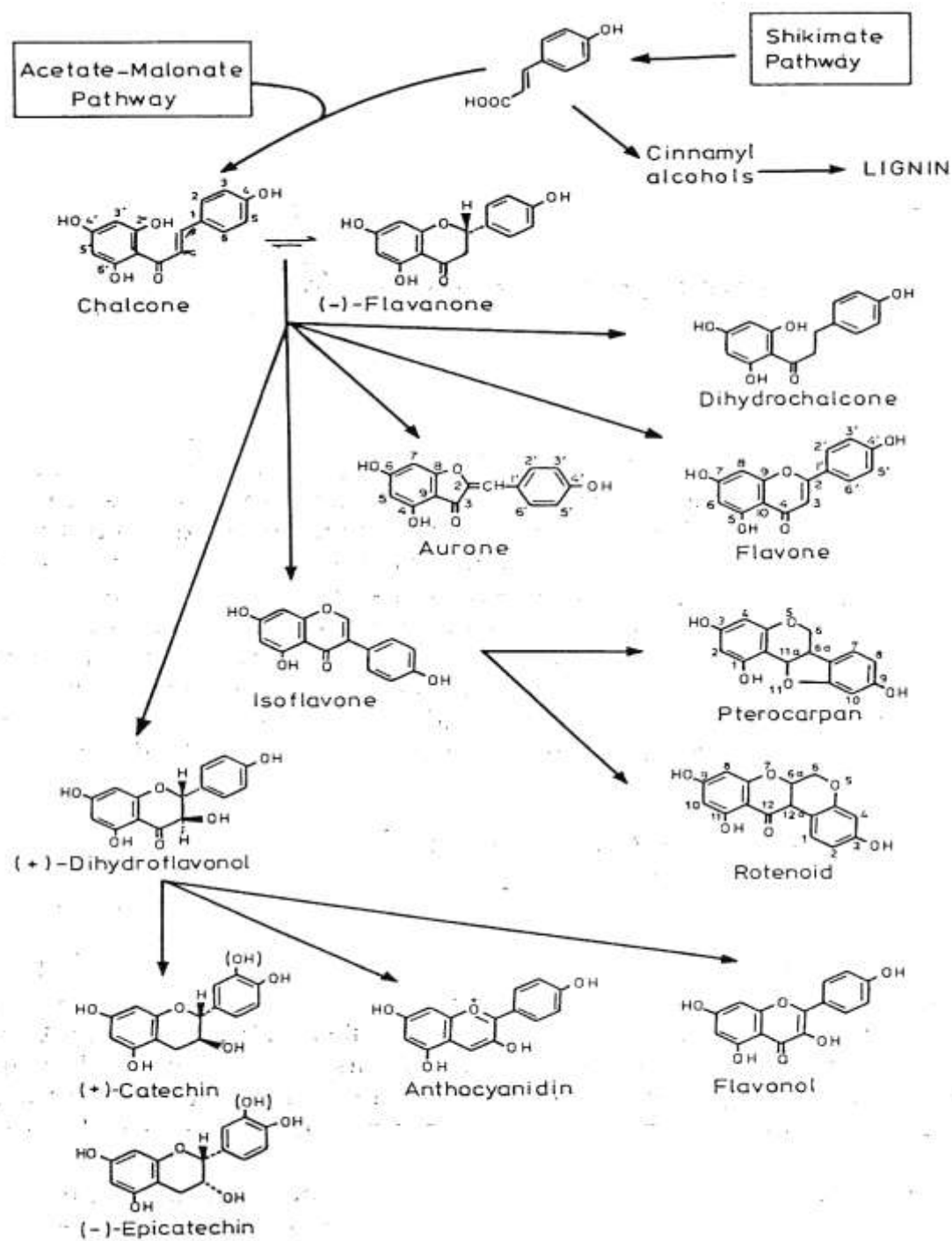
Χαλκόνη



Αουρόνη

Βιοσύνθεση Φλαβονοειδών

Όλα τα φλαβονοειδή έχουν κοινό βιοσυνθετικό δρόμο και ως εκ τούτου έχουν τον ίδιο βασικό σκελετό. Προέρχονται από τη συσσωμάτωση δύο άλλων δρόμων του άλατος του σικιμικού και μαλονικού οξέος. Το πρώτο φλαβονοειδές που προέκυψε από τη συνένωση των δύο δρόμων είναι η χαλκόνη και από αυτή με την επίδραση διαφόρων ενζυμικών συστημάτων προέκυψαν οι άλλοι τύποι των φλαβονοειδών (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7. Σκελετός βιοσύνθεσης Φλαβονοειδών.

Θεραπευτικές ιδιότητες: Αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές

Τα φλαβονοειδή του Citrus ιδίως τα πολυμεθυλιωμένα όπως tangeretin και nobiletin παρουσιάζουν έντονη ανασταλτική δράση στους καρκινικούς όγκους από ότι τα υδροξυλιωμένα παράγωγα. Λόγω του αριθμού και της θέσης των ελευθέρων OH. Σαν ισχυρότερα αντιοξειδωτικά θεωρούνται η κερκετίνη,

μυρικετίνη, γκοσυπετίνη, κερκεταγενίνη. Η κερκετίνη εμποδίζει την οξειδωση των πολυακορέστων λιπαρών οξέων και προστατεύει στους χυμούς των εσπεριδοειδών από την αυτοοξειδωση της βιταμίνης C. Οι ενώσεις αυτές έχουν την ικανότητα να παγιδεύουν το ανιόν υπεροξειδίου (www.iama.gr).

1.8.2 Δράση Φλαβονολών

Καμφερόλη

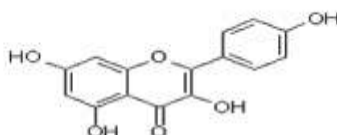
Η καμφερόλη (3, 40, 5, 7-τετραϋδροφλαβόνη) ανήκει στις φλαβονόλες και είναι ένα σημαντικό συστατικό της διατροφής. Στην Ιαπωνία, η καμφερόλη αντιπροσωπεύει το 35,3% της συνολικής πρόσληψης φλαβονοειδών των γυναικών. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, αποτελεί το 22% των διαιτητικών φλαβονολών/φλαβονών για τις γυναίκες και το 20% για τους άνδρες. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η υψηλή πρόσληψη καμφερόλης συνδέεται με υποτροπίαση προηγμένου αδενώματος παχέος εντέρου. Έχει βρεθεί ότι οι διαιτητικές φλαβονόλες, όπως και η καμφερόλη έχουν προληπτικές και θεραπευτικές ιδιότητες σε διάφορες μορφές καρκίνου. Πραγματοποιήθηκε μελέτη για τη διερεύνηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της καμφερόλης, εναντίον των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Bobe et al., 2008). Επιπλέον, σε σύγκριση με άλλες καθημερινές διατροφικές φλαβονόλες, η καμφερόλη έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με τη μείωση κινδύνου του καρκίνου των ωοθηκών, του παγκρέατος και του στομάχου. Επίσης, η καμφερόλη μπορεί να ασκεί ισχυρή δραστηριότητα εναντίον του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, των κυττάρων μη-μικροκυτταρικού πνεύμονα και των κυττάρων λευχαιμίας και για προληπτικούς λόγους μπορεί να είναι διατροφικό συστατικό κατά διαφόρων τύπων καρκίνου.

Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η καμφερόλη ενισχύει την TRAIL-επαγόμενη απόπτωση στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα sw480, παχέος εντέρου, και προτάθηκε ως ευαισθητοποιητής χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες (Yoshida et al., 2008). Μια άλλη μελέτη επικεντρώνεται στην διαφοροποίηση δραστηριότητας της καμφερόλης σε διάφορες κυτταρικές σειρές του καρκίνου του παχέος εντέρου. Βρέθηκε αυξημένη διαφοροποίηση

και λειτουργία χασμοσυνδέσμου μετά από εφαρμογή χαμηλής δόσης καμφερόλης σε κύτταρα KNC αλλά όχι σε HCT116 κύτταρα. Ωστόσο, η πιθανή επίδραση στην αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου με απλή θεραπεία σε υψηλότερες δόσεις καμφερόλης δεν έχει ακόμη διερευνηθεί επαρκώς (Nakamura et al., 2005).

Η ικανότητα ανθεκτικότητας στην απόπτωση είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των περισσότερων τύπων καρκινικών όγκων. Στη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου, ο ρόλος της απόπτωσης είναι επίσης προφανής. Ιστολογικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η απόπτωση μειώνεται καθώς τα κύτταρα παχέος εντέρου υποβάλλονται με γενετικές μεταλλάξεις σε καρκίνωμα. Επιπλέον, ένα άθικτο p53-Bax αποπτωτικό μονοπάτι έχει αναφερθεί ότι συνδέεται καλύτερα με ασθενείς που επιβιώνουν από καρκίνο παχέος εντέρου και δικαιολογεί τον p53-Bax άξονα να παίζει ρόλο στον περιορισμό ανάπτυξης του καρκίνου και να χρησιμοποιηθεί ως στόχος για την θεραπεία του καρκίνου και για την πρόληψη του.

Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι η καμφερόλη προκάλεσε απελευθέρωση c κυτοχρώματος από τα μιτοχόνδρια και ενεργοποίηση διάσπασης της 3-κασπάσης. Η οικογένεια Bcl-2 πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένης της PUMA (p53-Upregulated Modulator of Apoptosis) συμμετείχαν σε αυτή τη διαδικασία. Η καμφερόλη προκάλεσε επίσης φωσφορυλίωση της ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) και της H2AX σε HCT116 κύτταρα και η αναστολή της ATM από ένα χημικό αναστολέα κατέληξε σε κατάργηση των καθοδικά αποπτωτικών κλιμακωτών αντιδράσεων. Οι έρευνες υποδηλώνουν ότι η καμφερόλη θα μπορούσε να είναι ένας ισχυρός υποψήφιος παράγοντας καταπολέμησης καρκίνου του παχέος εντέρου (Li et al., 2009).

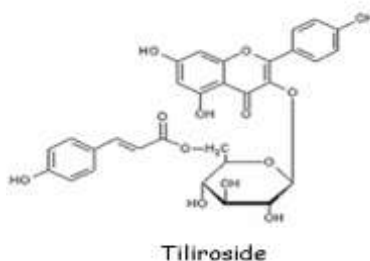


Kaempferol

Ακετυλιωμένο παράγωγο του 3-O-γλυκοζίδιο της καμφερόλης

Έχει αναφερθεί ότι τα γλυκοζίδια της καμφερόλης έχουν *in vitro* κυτταροτοξική δράση, παρεμβαίνοντας στον κυτταρικό κύκλο των ανθρώπινων λευχαιμικών κυτταρικών σειρών και στην οδό σύνθεσης του DNA προκαλώντας απόπτωση στα κύτταρα. Πρόσφατα έχει δείχθει ότι τα γλυκοζίδια της καμφερόλης μπορούν να αναστέλλουν τις P90 ριβοσωμικές S6 κινάσες (RSKs) και τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Ως γνωστόν, αυτές εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος που ενεργοποιείται από το MAPK/ERK μονοπάτι, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα γλυκοζίδια της καμφερόλης και οι RSKs μπορούν να είναι σημαντικά για την ανάπτυξη νέων σκοπούμενων χημειοθεραπευτικών ενώσεων καταπολέμησης καρκίνου.

Πειραματικά αποτελέσματα αποδεικνύουν πως το ακετυλιωμένο παράγωγο του 3-O-γλυκοζιδίου της καμφερόλης παρουσιάζει αντιπολλαπλασιαστική δράση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT116 και HT29 που αφορούν τον καρκίνο του παχέος εντέρου καθώς και κυτταροτοξική δραστηριότητα σ' αυτές. Επομένως, το ακετυλιωμένο παράγωγο του 3-O-γλυκοζιδίου της καμφερόλης θα μπορούσε να έχει παρόμοια δράση με τη καμφερόλη ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας (Tsimplouli et al., 2011). Το συγκεκριμένο γλυκοζίδιο μελετάται στη παρούσα εργασία ως φλαβονόλη με τη συντομογραφία TAC.



Κερκετίνη

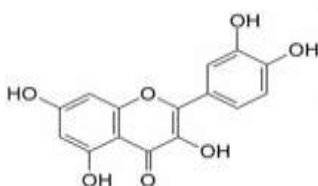
Η κερκετίνη, (3',4',5,7 τετραϋδροξυφλαβονόλη) συνήθως βρίσκεται στα εσπεριδοειδή, στη σίκαλη και στα κρεμμύδια, έχει χρησιμοποιηθεί στην κλασική ιατρική για την πρόληψη ή τη θεραπεία ποικίλων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και νευρικές διαταραχές, η παχυσαρκία και η χρόνια φλεγμονή. Αν και οι βιολογικές ιδιότητες και ο μηχανισμός δράσης της

είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστα, η μοριακή δομή της κερκετίνης είναι πολυ-λειτουργική και μπορεί να ενεργεί εν μέρει τουλάχιστον, μέσω ενός μιτοχονδριακού μηχανισμού. Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η βασική δράση της κερκετίνης είναι αντιοξειδωτική, ενώ άλλες προτείνουν αντιφλεγμονώδη δράση. Η τελευταία είναι πιθανή με τη μεσολάβηση αρκετών μηχανισμών που περιλαμβάνουν αναστολή των πυρηνικών παραγόντων NF-kB, ενεργοποίηση και διαφοροποίηση της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS), της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), και της έκφρασης της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) (Nam et al., 2006, Teixeira et al., 2002, García-Mediavilla et al., 2007).

Οι φλαβονόλες, όπως η κερκετίνη, είναι αναμφισβήτητα το επίκεντρο σε φαρμακολογικές έρευνες απ' ό,τι τα περισσότερα φλαβονοειδή. Η κερκετίνη έχει δείξει χημειοθεραπευτικές ιδιότητες σε τρωκτικά με καρκίνο του παχέος εντέρου, του στόματος, του τραχήλου της μήτρας και του πνεύμονα, και έχει υποβληθεί σε μια φάση μία κλινική δοκιμή σε καρκινοπαθείς ασθενείς (Howells et al., 2010).

Χρησιμοποιήθηκαν τόσο φυσικές όσο και βιολογικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας της κερκετίνης και της επίδρασης της στη μιτοχονδριακή λειτουργία και στη παραγωγή NO υπό την προσβολή λιποπολυσακχαριτών (LPS) (Zhang et al., 2011).

Σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, η κερκετίνη έχει μεγάλο εύρος βιοχημικών και βιολογικών δραστηριοτήτων και συμβάλλει στη συνολική θεραπευτική δράση. Πρώτα απ' όλα, η αντιοξειδωτική του δράση μπορεί να αναστείλει τόσο την καρκινογένεση όσο και την κυτταρική βλάβη εξαιτίας των αντιδράσεων των ριζών. Επιπλέον, προκαλεί αναστολή ανάπτυξης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, περιλαμβάνοντας και τα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου και μπορεί να επιφέρει απόπτωση σ' αυτά. Η κερκετίνη μπορεί επίσης να προτρέψει μειορρύθμιση ογκογονιδίων, όπως το *ras* και το *myc* και να εισάγει τον άγριο τύπο του παράγοντα p53 (Richter et al., 1999).



Quercetin

2^ο ΜΕΡΟΣ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

A. Θρεπτικό διάλυμα για καλλιέργεια κυττάρων:

A.1 DMEM με δείκτη κόκκινο της φαινόλης (phenol red) και εμπλουτισμένο με 10% FBS ορό, 1% L-γλουταμίνη και 1% Penicillin/Streptomycin

A.2 DMEM χωρίς phenol red, και εμπλουτισμένο με 10 % cis FBS (ορός κατεργασμένος με ζωάνθρακα προς απομάκρυνση στεροειδών ορμονών), 1% L-γλουταμίνη και 1% Penicillin/Streptomycin

B. Διάλυμα για πειράματα διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων:

- OPTIMEM

Γ. Κρυοπροστατευτικό διάλυμα κυττάρων

- DMSO 10%
- FBS 90%

Δ. Χημικά

- DMEM (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)
- Lipofectamin 2000 (Invitrogen)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaH₂PO₄ (Merck)
- NaOH (Merck)
- OPNG (o-nitrophenyl-β-D-galactosidase), ATP (Sigma)

- Beetle Lyciferin, Potassium Salt PRMG E1601
- Trypsin-EDTA 0.25% 10x (Gibco)
- Αιθανόλη (Merck)
- Β-Μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- Lysis Buffer (Promega)
- Lysis Buffer 5x (PRMG E3971)

Ε. Κυτταρικές σειρές

HCT116: Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου

ΣΤ. Όργανα

Χρησιμοποιήθηκαν όργανα και αναλώσιμα από:

- Αίθουσα κυτταροκαλλιεργειών TBB
- Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας TBB

Τα σημαντικότερα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5810R eppendorf
- Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5415R
- Λουμινόμετρο (Berhold)
- Φωτόμετρο (Spectronic Instruments)
- Αναδευτήρας τύπου GFL 3015
- Πεχάμετρο (744 Ph Meter, Ω. Metrohm)
- Ζυγός (Kern)

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Διαδικασίες για καλλιέργεια κυττάρων HCT116

1. Απόψυξη κυττάρων HCT116

Αρχικά, τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα στους -80°C , όπου ήταν αποθηκευμένα, τοποθετούνται αμέσως στο υδατόλουτρο στους 37°C , ώστε να ξεπαγώσουν. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με 70% αιθανόλη εξωτερικά ώστε να μεταφερθεί στον απαγωγό για διατήρηση στείρων συνθηκών. Έπειτα ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε πλαστικό σωλήνα (falcon) 15mL και γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένο με 10%FBS και 1%L-Γλουταμίνη και 1%Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση των κυττάρων στους 37°C ώστε να επιτευχθεί προσκόλληση τους στο ταπήτιο της πλαστικής φλάσκας.

2. Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με θρυψίνη (θρυψινοποίηση)

Η ανακαλλιέργεια με θρυψίνη πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει σχεδόν όλο το ταπήτιο της φλάσκας (90%-100% πληρότητα), οπότε δεν υπάρχει πλέον χώρος ώστε να αναπτυχθούν περαιτέρω. Αρχικά, παρατηρούνται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο και ελέγχεται η μορφολογία τους καθώς και η πληρότητα του ταπητίου τους (confluency). Έπειτα, απομακρύνεται (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας και προστίθεται διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.25%. Στη συνέχεια, ανακινείται η φλάσκα έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο και παρατηρούνται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Παράλληλα, με ελαφρά χτυπήματα στη φλάσκα, αποκολλώνται τα κύτταρα από το ταπήτιο της φλάσκας και προστίθεται πενταπλάσιος όγκος θρεπτικού υλικού για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. Λαμβάνεται, στη συνέχεια, η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων (1/10 για κύτταρα HCT116) για τη νέα φλάσκα και προστίθεται η επιθυμητή

ποσότητα θρεπτικού υλικού. Τέλος, διασπείρονται τα κύτταρα ομοιόμορφα στη φλάσκα ώστε να αναπτυχθούν.

3. Συλλογή και αποθήκευση κυττάρων

Αρχικά, για τη συλλογή κυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό τους υλικό και ακολουθεί θρυψινοποίηση, μεταφορά σε falcon 15mL και φυγοκέντρηση για 5min στις 1200rpm στους 22°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται FBS και αναδεύεται καλά. Στη συνέχεια, λαμβάνεται ποσότητα από το falcon και προστίθεται σε cryovial (9 όγκοι). Τέλος, προστίθεται DMSO (1 όγκος) και φυλάσσεται στους -80°C.

4. Μέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια αιμοκυττόμετρου (πλάκα Newbuer).

2.2.2 Διαμόλυνση κυττάρων HCT116 με λιποφεκταμίνη

Η διαμόλυνση με λιποφεκταμίνη είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για να εισαχθεί γενετικό υλικό μέσα σε κύτταρα μέσω των λιποσωμάτων τα οποία εύκολα μπορούν να απορροφηθούν από την κυτταρική μεμβράνη αφού και τα δύο αποτελούνται από φωσφορική διπλοστιβάδα. Τα βασικά πλεονεκτήματά της είναι η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης σε όλους τους τύπους νουκλεϊκών οξέων και σε πολλά είδη κυττάρων, ενώ παράλληλα υπάρχει ευκολία στη χρήση της και σχετικά χαμηλή τοξικότητα.

Διαδικασία:

- 1) Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει θρυψινοποίηση μιας T25 φλάσκας στην οποία η πληρότητα σε κύτταρα είναι περίπου 100%. Έπειτα,

προσδιορίζεται ο αριθμός των κυττάρων με μέτρηση σε πλάκα Newbuer (αιμοκυττόμετρο).

- 2) Σε κάθε well ενός 24-well plate προστίθενται 7×10^4 κύτταρα από τα παραπάνω θρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε να υπάρχει πληρότητα περίπου 70%-80% την επόμενη μέρα σε κάθε well μετά από επώαση στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση.
- 3) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιείται λιποφεκταμίνη. Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και λιποφεκταμίνης είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης.
- 4) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζονται δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα Lipo mix σύμφωνα με τους εξής κανόνες:
 - i) ο λόγος γ DNA/λ χρησιμοποιούμενης λιποφεκταμίνης ισούται με 1/2
 - ii) 50λ OPTIMEM/γ DNA (για προετοιμασία του DNA mix)
 - iii) 50λ OPTIMEM/2λ Λιποφεκταμίνης (για την προετοιμασία του Lipo mix)
 - iv) 0,5γ DNA απαιτείται για τη διαμόλυνση των κυττάρων κάθε well ενός 24-well plate.
- 5) Για την παρασκευή του transfection mix αναμιγνύονται τα DNA mix και Lipo mix και αφήνονται να επωαστούν για 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (50μL/well DNA-Lipo mix).
- 6) Παράλληλα απομακρύνεται από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση. Πριν την προσθήκη του transfection mix προστίθεται θρεπτικό OPTIMEM χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητωτικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (0,2mL/well).
- 7) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζεται το τελευταίο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και το 24-well plate μένει για επώαση στους 37°C.
- 8) Έπειτα από 4 ώρες, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και αντικαθιστάται με (αρχικά στο πρώτο πείραμα DMEM phenol red με 10% FBS) DMEM w/o phenol red (για την αποφυγή της παρεμβολής της δράσης της φαινόλης στον προσδιορισμό της δραστηριότητας των υπό εξέταση φλαβονολών) cis

FBS, 1% Αντιβιοτικά (pen/strep), 1% L-γλουταμίνη (πλήρες θρεπτικό υλικό).

9) Κατόπιν, επωάζονται τα κύτταρα για (24 ώρες αρχικά στο πρώτο πείραμα) 48 ώρες.

10) Έπειτα, γίνεται έκπλυση με κρύο PBS και λύση σε LB×1(Promega) (70μL/well) για 30 λεπτά στους 4°C.

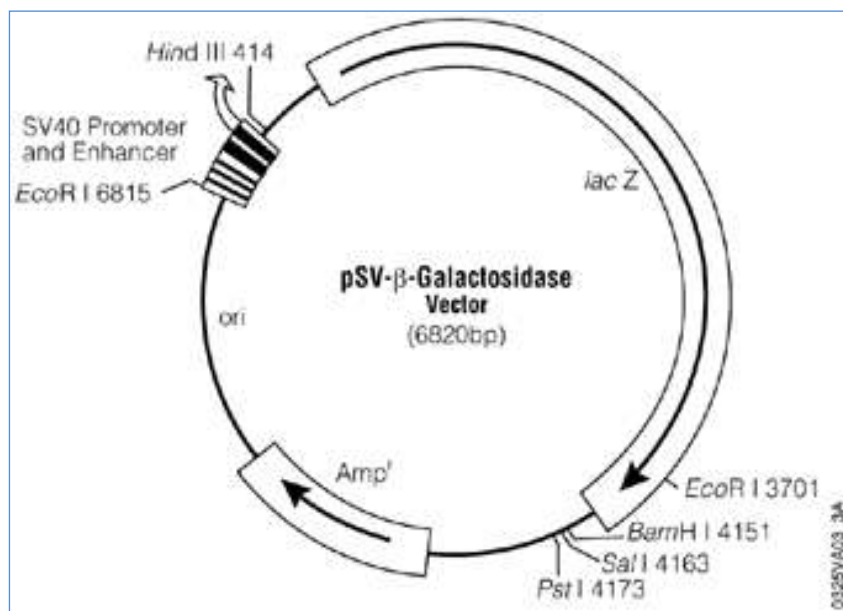
11) Στη συνέχεια, συλλέγονται τα κύτταρα και φυγοκεντρώνονται για 20 λεπτά στις 13.500rpm.

12) Τέλος, το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται στους -80°C.

Πλασμιδιακοί φορείς

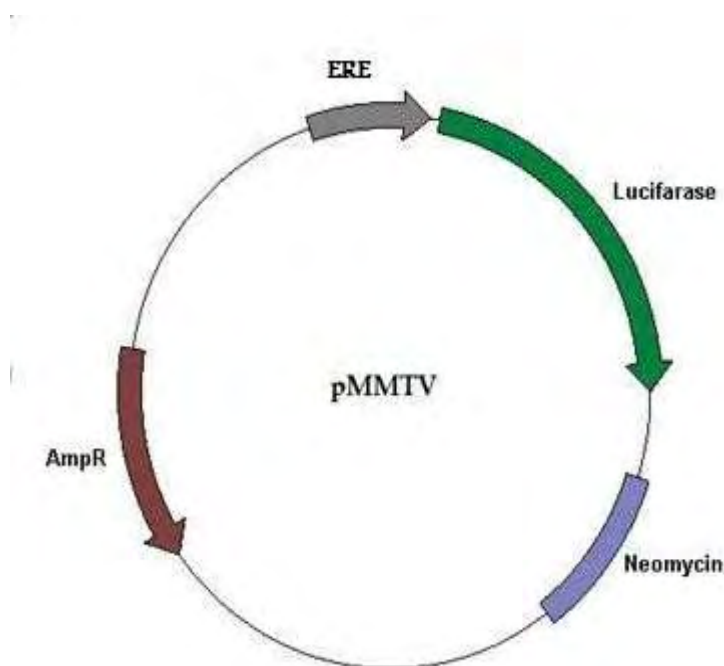
Τα κύτταρα HCT116 διαμολύνθηκαν με τους ακόλουθους πλασμιδιακούς φορείς:

A) Πλασμιδιακός φορέας β-gal:



Εικόνα 8. Πλασμιδιακός φορέας β-gal (pSV-β-gal).

Β) Πλασμιδιακός φορέας pMMTV-ERE-luciferase:



Εικόνα 9. Πλασμιδιακός φορέας pMMTV-ERE-luciferase, όπου ο υποκινητής φέρει EREs αλληλουχίες.

Γ) Πλασμιδιακός φορέας pECFPC2-ERα (πλασμίδιο που περιέχει γονίδιο έκφρασης για τον υποδοχέα ERα)

Δ) Πλασμιδιακός φορέας pECFPC2-ERβ (πλασμίδιο που περιέχει γονίδιο έκφρασης για τον υποδοχέα ERβ)

2.2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοζιδάσης

1. Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας λουσιφεράσης

Αρχή της μεθόδου:

Στις αντιδράσεις χημειοφωταύγειας, το φώς παράγεται από την οξείδωση της λουσιφερίνης (μια χρωστική):

- Luciferine + O₂ → oxiluciferin + light

Οι πιο συνηθισμένες αντιδράσεις ανοσοφθορισμού απελευθερώνουν CO₂ σαν προϊόν. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την παρουσία συμπαράγοντων, όπως ιόντα ασβεστίου ή ATP. Η αντίδραση καταλύεται από τη λουσιφεράση και πραγματοποιείται σε δύο βήματα:

- Luciferine + ATP → Luciferyl adenylate + PPi
- Luciferyl adenylate + O₂ → oxiluciferin + AMP + light

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλη η ενέργεια που εισέρχεται μετατρέπεται σε φως.

Διαδικασία:

Για τη μέθοδο της λουσιφεράσης τα κύτταρα HCT116 καλλιεργούνται σε 24-well plate, σε τελικό όγκο καλλιέργειας και θρεπτικού 0,5mL στο κάθε well. Αφού πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση των κυττάρων, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, μετά από δύο μέρες πραγματοποιείται η διαδικασία λύσης - συλλογής των κυττάρων και προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοζιδάσης. Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τις κυτταρικές καλλιέργειες HCT116 και τα πιάτα ξεπλένονται με 1x PBS και στη συνέχεια προστίθεται 70μL 5x Lysis Buffer (PRMG E3971) και τα κύτταρα επωάζονται στους 4°C, αναδεύονται για 30 λεπτά και συλλέγονται σε δύο eppendorfs. Έπειτα, πραγματοποιείται η μέθοδος προσδιορισμού της σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης, όπου χρησιμοποιούνται από κάθε δείγμα 15μL κυτταρικού εκχυλίσματος και 100μL διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης έχει προετοιμαστεί νωρίτερα και αποτελείται από 20mM Tris PH:8 2.67mM MgSO₄, 0,1mM EDTA, 33,3mM DTT, 270μM Co-enzyme-A, 470μM Luciferine, 530μM ATP, ddH₂O. Η σχετική ενεργότητα της λουσιφεράσης μετριέται στο λουμινόμετρο σε μονάδες RLU (Relative Luciferase Unit). Ύστερα από τη μέτρηση της σχετικής ενεργότητας της λουσιφεράσης, πραγματοποιείται η διαδικασία μέτρησης της σχετικής δραστηριότητας της β-γαλακτοζιδάσης, η οποία πραγματοποιείται για την επίτευξη της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων, δεδομένου ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονίδιου της β-γαλακτοζιδάσης είναι ανάλογα της δραστηριότητας του ενζύμου.

2. Μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας β-γαλακτοζιδάσης

Αρχή της μεθόδου:

Η ενζυμική δραστηριότητα της β-γαλακτοζιδάσης μπορεί να αναλυθεί, μετρώντας την υδρόλυση του χρωμογόνου υποστρώματος, OPNG (o-nitrophenyl-β-D-galactosidase) όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Miller, 1972).



Το ποσό της ο-νιτροφαινόλης που σχηματίζεται μπορεί να μετρηθεί προσδιορίζοντας την απορρόφηση στα 420nm. Αν το OPNG που προστίθεται είναι σε περίσσεια τότε το ποσό της ο-νιτροφαινόλης που παράγεται είναι ανάλογο του ποσού της β-γαλακτοζιδάσης και του χρόνου της αντίδρασης. Η αντίδραση σταματά προσθέτοντας Na₂CO₃ το οποίο διαμορφώνει το pH της αντίδρασης στο 11. Σε αυτό το pH η ο-νιτροφαινόλη μετατρέπεται σε κίτρινη ανιονική μορφή και η β-γαλακτοζιδάση απενεργοποιείται.

Διαδικασία:

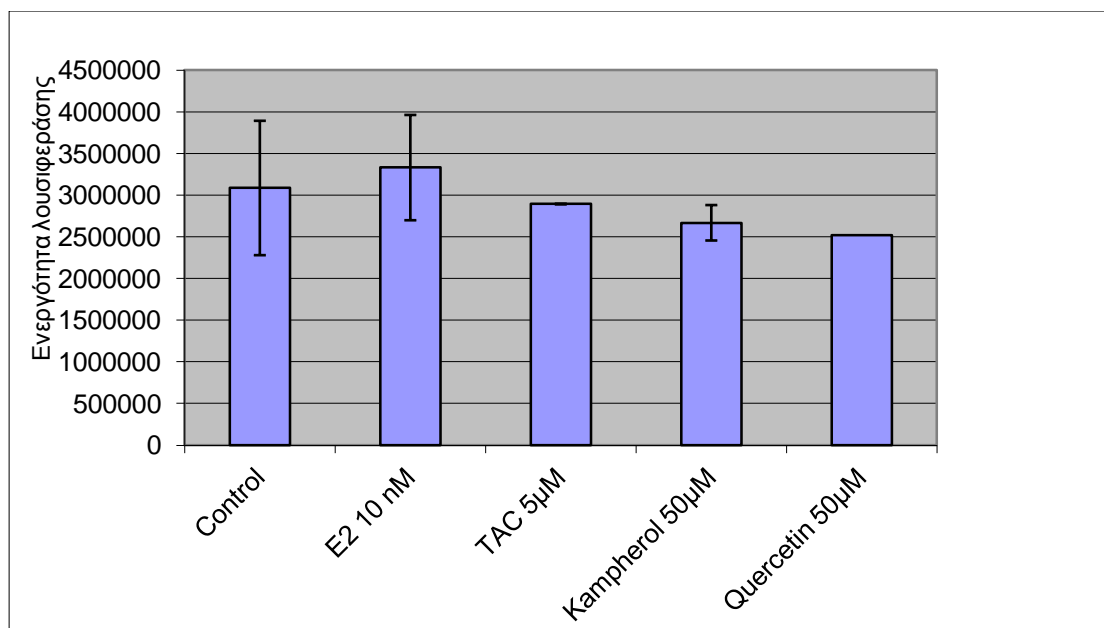
Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης για κάθε δείγμα, χρησιμοποιούνται 3μL 27x διάλυμα Mg, 201μL 0.1 sodium phosphate (pH:7,5), 25μL κυτταρικού εκχυλίσματος και 66μL 1x ONPG που είναι και το υπόστρωμα της β-γαλακτοζιδάσης. Ετοιμάζεται πάντα και ένα δείγμα ελέγχου το οποίο περιέχει όλα τα διαλύματα της αντίδρασης και του Lysis Buffer εκτός από το κυτταρικό εκχύλισμα. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 37°C μέχρι να αρχίσει να πραγματοποιείται η αντίδραση και τα δείγματα να αποκτήσουν κίτρινο χρώμα, λόγω του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης. Μόλις τα δείγματα αποκτήσουν σχετικά έντονο κίτρινο χρώμα, τερματίζεται η αντίδραση με την προσθήκη 500μL 1M Na₂CO₃. Τέλος, μετρείται η απορρόφηση για κάθε δείγμα στα 420nm στο φασματοφωτόμετρο. Η μέτρηση αρχικά ρυθμίζεται βάσει της μηδενικής τιμής του δείγματος ελέγχου. Η αποτελεσματικότητα της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης υπό την επίδραση του υποδοχέα οιστρογόνων είναι ανάλογη της δραστηριότητάς της, η οποία εκφράζεται από το λόγο των μονάδων της σχετικής ενεργότητας της λουσιφεράσης (RLU) προς τις σχετικές μονάδες ενεργότητας της β-gal. Τα

αποτελέσματα αναπαριστώνται σε διάγραμμα με τη χρήση του προγράμματος Microsoft excel.

3ο ΜΕΡΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Διερεύνηση της δράσης των υπό εξέταση φλαβονολών στη δραστικότητα των ενδογενών υποδοχέων οιστρογόνων, ER σε κύτταρα HCT116

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων HCT116 με α) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της β-gal υπό τη δράση ισχυρού υποκινητή CMV (pSV-β-gal) και β) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο οιστρογόνο-εξαρτώμενου υποκινητή (pMMTV-ERETK-luciferase). Στη συνέχεια, μετά την παραμονή των κυττάρων για 24h στο υλικό ανάπτυξης τους, μελετήθηκε η δράση της α) οιστραδιόλης, E_2 $10^{-9}M$, β) TAC, $5\mu M$, γ) καμφερόλης (kampherol), $50\mu M$ και δ) κερκετίνης, quercetin $50\mu M$ στη δραστικότητα των ενδογενών υποδοχέων ER. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις, οι οποίες σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα παρουσιάζουν αποπτωτική, αντικαρκινική δράση σε κύτταρα HCT116 (Tsimplouli et al., 2011). Μετά από 6h σε $37^{\circ}C$ τα κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης κυττάρων DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin και 1% L-γλουταμίνη και ακολούθησε κυτταρική λύση και προσδιορισμός της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Παρατηρήθηκε ότι οι φλαβονόλες TAC, Kampherol και Quercetin παρουσιάζουν οριακή αναστολή της δράσης των ενδογενών υποδοχέων οιστρογόνων, ER των κυττάρων HCT116 (**Σχήμα 1**), οι οποίοι πιθανόν να έχουν ενεργοποιηθεί υπό συνθήκες παρουσίας οιστρογόνων στον ορό του καλλιεργητικού υλικού. Στο Σχήμα 1 απεικονίζεται η δράση των φλαβονολών όπου στον κάθετο άξονα είναι μονάδες ενεργότητας της λουσιφεράσης (σχετικές μονάδες ενεργότητας λουσιφεράσης/σχετικές μονάδες ενεργότητας β-γαλακτοζιδάσης) και στον οριζόντιο άξονα, οι συνθήκες που μελετήθηκαν: κύτταρα μάρτυρες (control), κύτταρα που έχουν επωαστεί με α) E_2 $10^{-9}M$, β) TAC $5\mu M$, γ) kampherol $50\mu M$ και δ) quercetin $50\mu M$.

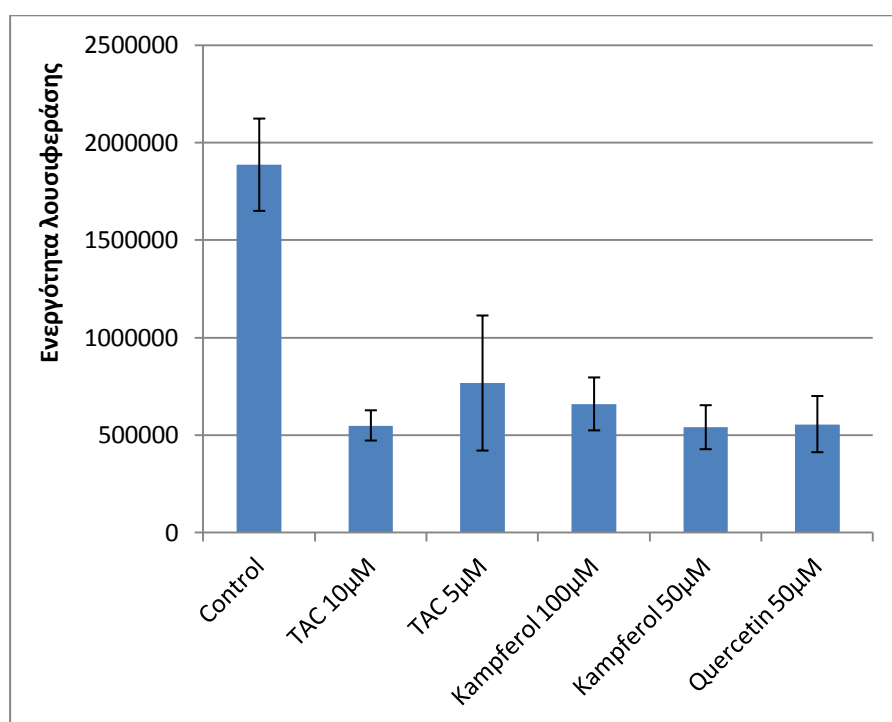


Σχήμα 1. Δράση της παρουσίας των φλαβονολών TAC, Kampherol και Quercetin στη δραστικότητα των ενδογενών υποδοχέων οιστρογόνων ER στο υλικό ανάπτυξης κυττάρων HCT116.

3.2 Διερεύνηση της δράσης των υπό εξέταση φλαβονολών στη δραστικότητα των ενδογενών ER σε κύτταρα HCT116 υπό συνθήκες εξάλειψης της παρουσίας αγωνιστών-ανταγωνιστών των ER από το υλικό ανάπτυξής τους

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης DMEM w/o phenol red (το οποίο δεν έχει φαινολικές ομάδες, για την αποφυγή της παρεμβολής της δράσης της φαινόλης στον προσδιορισμό της δραστικότητας των υπό εξέταση φλαβονολών), cis FBS (ορός από νεογέννητα βοοειδή, ο οποίος έχει υποστεί κατεργασία με ζωάνθρακα προς απομάκρυνση στεροειδών ορμονών, που περιέχονται σε αυτόν). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HCT116 με πλασμίδια που φέρουν γονίδια, που κωδικοποιούν την έκφραση της α) β-gal και της β) λουσιφεράσης. Μετά από παραμονή των κυττάρων για 48h στο προαναφερθέν υλικό ανάπτυξης, μελετήθηκε η δράση των φλαβονολών: α) TAC 10μM β) TAC 5μM, γ) kampherol 100μM, δ) kampherol 50μM και ε) quercetin 50 μM στη δραστικότητα ενδογενών υποδοχέων ER. Μετά από

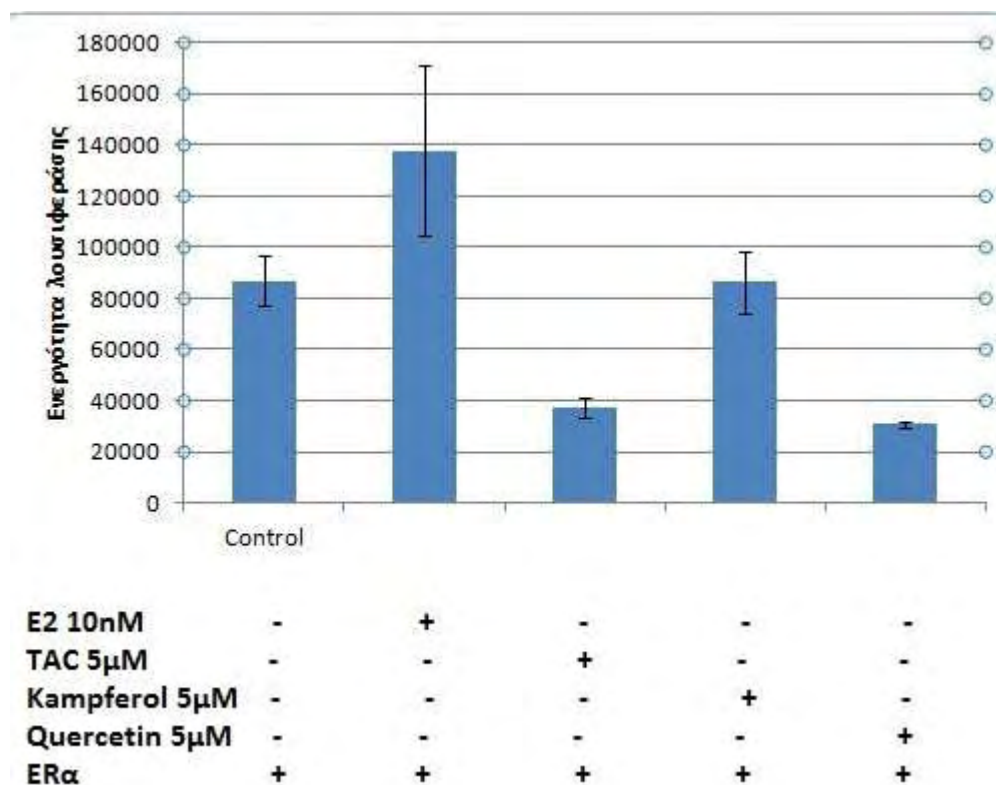
επώαση τους για 6h, σε 37°C, με τα υπό εξέταση κύτταρα ακολούθησε κυτταρική λύση και προσδιορισμός ενεργότητας της λουσιφεράσης. Παρατηρήθηκε ότι οι флаβονόλες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αναστολή της δραστηριότητας των ενδογενών υποδοχέων οιστρογόνων των κυττάρων HCT116 (**Σχήμα 2**). Στο Σχήμα 2 απεικονίζεται η δράση των флаβονολών όπου στον κάθετο άξονα είναι μονάδες ενεργότητας της λουσιφεράσης (σχετικές μονάδες ενεργότητας λουσιφεράσης/σχετικές μονάδες ενεργότητας β-γαλακτοζιδάσης) και στον οριζόντιο άξονα, οι συνθήκες που μελετήθηκαν: κύτταρα μάρτυρες (control), κύτταρα που έχουν επωαστεί με α) TAC 10μM β) TAC 5μM, γ) kampherol 100μM, δ) kampherol 50μM και ε) quercetin 50 μM.



Σχήμα 2. Δράση της παρουσίας των флаβονολών TAC, Kampherol (K) και Quercetin (Q) στη δραστηριότητα των ER υπό συνθήκες εξάλειψης της παρουσίας των αγωνιστών-ανταγωνιστών των ER στο υλικό ανάπτυξης των κυττάρων HCT116.

3.3 Διερεύνηση της δράσης των υπό εξέταση φλαβονολών στη δραστικότητα του ERα κατόπιν υπερέκφρασης του σε κύτταρα HCT116

Με σκοπό τη μελέτη της διαφορικής δράσης των υπό εξέταση φλαβονολών στους δύο τύπους των ER υποδοχέων (ERα και ERβ) πραγματοποιήθηκε αρχικά διαμόλυνση των κυττάρων HCT116 με α) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο του ERα υπό τη δράση ισχυρού υποκινητή (pECFPC2-ERα), β) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της β-gal υπό τη δράση ισχυρού υποκινητή CMV (pSV-β-gal), και με γ) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο οιστρογόνο-εξαρτώμενου υποκινητή (pMMTV-ERETK-luciferase). Μετά από παραμονή των κυττάρων για 48h σε θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης DMEM w/o phenol red, εμπλουτισμένου με 10% cis FBS, τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία ή απουσία των υπό εξέταση φλαβονολών: α) TAC 5μM, β) kampherol 5μM και γ) quercetin 5μM και της E2 10⁻⁹M (χρησιμοποιήθηκαν ίδιες συγκεντρώσεις των υπό εξέταση φλαβονολών, για την επίτευξη συγκριτικής μελέτης) για επιπλέον 6h σε 37°C. Στη συνέχεια ακολούθησε κυτταρική λύση και προσδιορισμός της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Παρουσία των TAC και quercetin παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αναστολή της δραστικότητας του ERα. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η ανασταλτική δράση των TAC και quercetin σε συγκέντρωση 5μM υπερσχύει στατιστικά σημαντικά σε σχέση με αυτή ίδιας συγκέντρωσης kampherol. Όπως αναμενόταν η παρουσία της οιστραδιόλης είχε σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ERα (**Σχήμα 3**). Στο Σχήμα 3 απεικονίζεται η δράση των φλαβονολών στην ενεργότητα του υποδοχέα ERα όπου στον κάθετο άξονα είναι μονάδες ενεργότητας της λουσιφεράσης (σχετικές μονάδες ενεργότητας λουσιφεράσης/σχετικές μονάδες ενεργότητας β-γαλακτοζιδάσης) και στον οριζόντιο άξονα, οι συνθήκες που μελετήθηκαν: κύτταρα μάρτυρες (control), κύτταρα που έχουν επωαστεί με α) E2 10⁻⁹M, β) TAC 5μM, γ) kampherol 5μM και δ) quercetin 5μM.

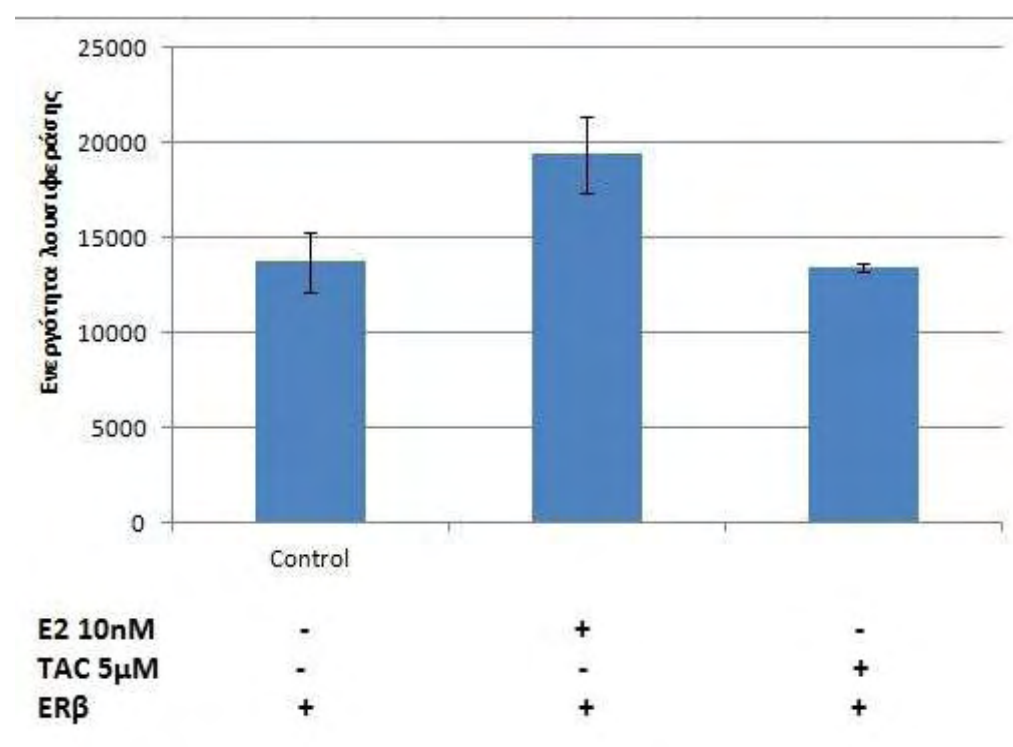


Σχήμα 3. Δράση των φλαβονολών TAC, Kampherol (K) και Quercetin (Q) στην ενεργότητα του ERα στο υλικό ανάπτυξης κυττάρων HCT116.

3.4 Διερεύνηση της δράσης της φλαβονόλης TAC στη δραστηριότητα του ERβ κατόπιν υπερέκφρασης του σε κύτταρα HCT116

Με σκοπό τη μελέτη της δράσης της φλαβονόλης TAC στον τύπο υποδοχέα οιστρογόνων ERβ, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων HCT116 με α) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο του ERβ υπό τη δράση ισχυρού υποκινητή (pECFPC2-ERβ), β) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της β-gal υπό τη δράση ισχυρού υποκινητή CMV (pSV-β-gal) και γ) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο οιστρογόνο-εξαρτώμενου υποκινητή (pMMTV-ERETK-luciferase). Μετά από παραμονή των κυττάρων για 48h σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης DMEM w/o phenol red, εμπλουτισμένο με 10% cis FBS, τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία ή απουσία της υπό εξέταση φλαβονόλης TAC 5μM και της E2 10^{-9} M για επιπλέον 6h σε 37°C. Στη συνέχεια ακολούθησε κυτταρική λύση και προσδιορισμός της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Παρατηρήθηκε ότι η TAC δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αναστολή στην ενεργότητα του υποδοχέα ERβ (**Σχήμα 4**). Στο

Σχήμα 4 απεικονίζεται η δράση της TAC στην ενεργότητα του ERβ όπου στον κάθετο άξονα είναι μονάδες ενεργότητας της λουσιφεράσης (σχετικές μονάδες ενεργότητας λουσιφεράσης/σχετικές μονάδες ενεργότητας β-γαλακτοζιδάσης) και στον οριζόντιο άξονα, οι συνθήκες που μελετήθηκαν: κύτταρα μάρτυρες (control), κύτταρα που έχουν επωαστεί με α) E2 10^{-9} M και β) TAC 5μM.

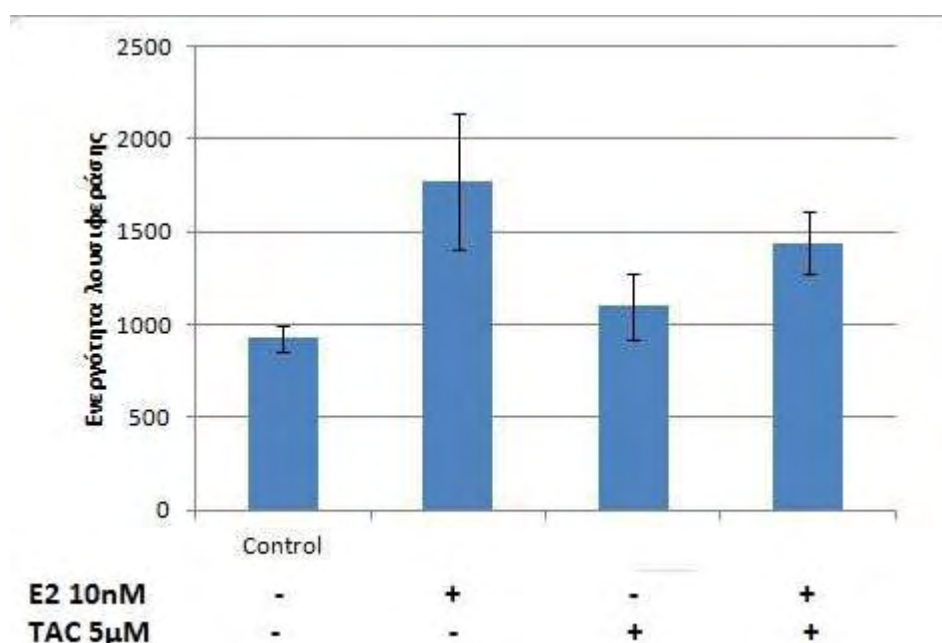


Σχήμα 4. Δράση της TAC στην ενεργότητα του ERβ στο υλικό ανάπτυξης κυττάρων HCT116.

3.5 Διερεύνηση της αντιοιστρογονικής δράσης της φλαβονόλης TAC σε κύτταρα HCT116

Με σκοπό την εξακρίβωση της αντιοιστρογονικής δράσης της TAC στη δραστικότητα των υποδοχέων ER πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων HCT116 με α) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της β-gal υπό τη δράση ισχυρού υποκινητή CMV (pSV-β-gal) και β) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο οιστρογόνο-εξαρτώμενου

υποκινητή (pMMTV-ERETK-luciferase). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δράση των α) E2 10^{-9} M και β) TAC 5 μ M σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης DMEM w/o phenol red, εμπλουτισμένου με 10% cis FBS. Μετά από παραμονή των κυττάρων για 48h στο υλικό ανάπτυξης, τα κύτταρα επωάστηκαν για 6h σε 37°C παρουσία ή απουσία της E2 και της TAC και ακολούθησε κυτταρική λύση και προσδιορισμός της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Παρατηρήθηκε έντονη αντιστρογονική δράση της φλαβονόλης (**Σχήμα 5**). Στο Σχήμα 5 απεικονίζεται η δράση της TAC όπου στον κάθετο άξονα είναι μονάδες ενεργότητας της λουσιφεράσης (σχετικές μονάδες ενεργότητας λουσιφεράσης/σχετικές μονάδες ενεργότητας β-γαλακτοζιδάσης) και στον οριζόντιο άξονα, οι συνθήκες που μελετήθηκαν: κύτταρα μάρτυρες (control) και κύτταρα που έχουν επωαστεί με α) E2 10^{-9} M β) TAC 5 μ M και γ) E2 10^{-9} M με TAC 5 μ M.



Σχήμα 5. Αντιστρογονική δράση της TAC στο υλικό ανάπτυξης κυττάρων HCT116.

4ο ΜΕΡΟΣ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα οιστρογόνα είναι φυλετικές στεροειδείς ορμόνες που εκκρίνονται στις γονάδες. Οι ορμόνες αυτές επηρεάζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των ιστών-στόχων. Επίσης ρυθμίζουν τη σεξουαλική ανάπτυξη και τις αναπαραγωγικές λειτουργίες εκτός από την λειτουργικότητα του καρδιαγγειακού, του κεντρικού νευρικού συστήματος και των οστών. Τα οιστρογόνα, ως υδρόφοβες ορμόνες, διαχέονται ελεύθερα και εισέρχονται στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Όταν εισέρθουν στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια, προσδένονται στους διαλυτούς υποδοχείς ERs (υποτύποι ERα και ERβ) και τους ενεργοποιούν. Πλέον, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο συνδέεται σε ένα στοιχείο ανταπόκρισης οιστρογόνων στο DNA-στόχο, το οποίο εκκινεί αυξανόμενη μεταγραφή των γονιδίων- στόχων.

Οι δύο υποδοχείς ERα και ERβ ενεργοποιούνται όταν η ορμόνη συνδέεται με τη δεσμευτική περιοχή προσδέματος (LBD) από τους υποδοχείς. Μετά την πρόσδεση, ακολουθούν αρκετές αλλαγές στους υποδοχείς, όπως συνολικές αλλαγές διαμόρφωσης των υποδοχέων, διμερισμός υποδοχέων, πυρηνική μετατόπιση και δέσμευση των υποδοχέων σε συγκεκριμένα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (EREs) στο DNA. Η δέσμευση των υποδοχέων με το πρόσδεμα ευνοεί την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με συρρυθμιστές (δηλαδή, συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς), οι οποίοι είναι αναδιαμορφωτές χρωματίνης, απαραίτητοι για την μεταγραφή γονιδίων που προκαλείται από την E2.

Ως γνωστόν, η 17β-οιστραδιόλη (E2), ως το πιο αποτελεσματικό γυναικείο οιστρογόνο, είναι κρίσιμης σημασίας για τον έλεγχο πληθώρας βιολογικών αντιδράσεων που επηρεάζουν σημαντικά διάφορες πτυχές της ανδρικής και γυναικείας φυσιολογίας. Έτσι, δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι η E2 και οι υποδοχείς της ERs θεωρούνται επίσης παράγοντες κινδύνου για την έναρξη και την εξέλιξη διαφόρων ενδοκρινικών καρκίνων (π.χ., του μαστού, του προστάτη, των ωοθηκών, και του ενδομητρίου). Ωστόσο, οι επιπτώσεις της E2 για τον καρκίνο είναι συχνά αποκλίνουσες και κάπως αντίθετες, εξαρτώμενες από τα σχετικά επίπεδα των ER υποτύπων σε κάθε καρκινικό κυτταρικό τύπο. Αυτές οι αντικρουόμενες επιδράσεις σχετίζονται με τη

πολυπλοκότητα του ενδοκυτταρικού σήματος της E2 που προκλήθηκε από τους υποδοχείς των οιστρογόνων (Acconcia and Marino, 2011).

Μελέτες έχουν δείξει πως σε καρκινικούς κυτταρικούς τύπους παχέος εντέρου Caco-2 και MC-26 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό ο ERα και ο ERβ παρουσιάζει χαμηλή μεταγραφική δραστηριότητα (Xu et al., 1994, Domenico et al., 1996). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η υπερέκφραση του ERα σε MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού σχετίζεται με αύξηση των καρκινικών όγκων του μαστού. Ενισχύοντας την άποψη ότι ο υποδοχέας ERα παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης (Arai et al., 2000). Έχει βρεθεί ότι ο ERβ και οι ισομορφές του οδηγούν σε απόπτωση των καρκινικών κύτταρων παχέος εντέρου σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ότι ο ERα (Campbell-Thompson et al., 2001). Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι γνωστό ότι ο ERβ έχει πιθανή αντικαρκινική δράση και ότι ανταγωνίζεται τον ERα. Επομένως, η παραγωγή στοχευμένων φάρμακων έναντι των δύο υποδοχέων έχει μέγιστη σημασία για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής της απόπτωσης, της καταστολής της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης, του πολλαπλασιασμού, της μετάστασης και της αγγειογένεσης σε καρκινικά κύτταρα.

Η απόπτωση είναι ένα από τα πιο σημαντικά μονοπάτια μέσω των οποίων τα αντικαρκινικά φάρμακα καταστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στους κυτταροστατικούς παράγοντες είναι ένα μείζον πρόβλημα στη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου. Καθώς κατανοούνται τα σηματοδοτικά μονοπάτια, που ελέγχουν την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα λόγω κυτταροστατικών παραγόντων, είναι ζωτικής σημασίας να βελτιωθεί η αντικαρκινική θεραπεία. Προς το παρόν, λίγοι αντικαρκινικοί παράγοντες, όπως τα φλαβονοειδή, φαίνεται να προκαλούν απόπτωση. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να διευκρινιστούν πλήρως οι διάφοροι μηχανισμοί που ευθύνονται για την αντικαρκινική δράση των φλαβονοειδών (Kanadaswami et al., 2005)

Είναι γνωστό πως το ακετυλιωμένο παράγωγο του 3-O-γλυκοζιδίου της καμφερόλης (TAC) έχει δράση αντικαρκινικού φαρμάκου. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση σε καρκινικές κυτταρικές

σειρές παχέος εντέρου HCT116 και HT29. Συνεπώς, ως φλαβονόλη, έχει ενδιαφέρον να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης του μέσω των υποδοχέων ERα και ERβ. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η μεταβολή της δράσης αυτών των υποδοχέων όταν ενεργοποιούνται/απενεργοποιούνται από συγκεκριμένες φλαβονόλες, οι οποίες είναι γνωστό ότι οδηγούν σε απόπτωση καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου, ώστε να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός δράσης των φλαβονολών.

Πιο συγκεκριμένα, για τη μελέτη της δράσης των φλαβονολών, Kampherol, TAC και Quercetin στη δραστηριότητα των υποδοχέων οιστρογόνων πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός δραστηριότητας των ER μετά από διαμόλυνση κυττάρων HCT116 με πλασμίδιο έκφρασης λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο οιστρογόνο-εξαρτώμενου υποκινητή, παρουσία ή απουσία των υπό εξέταση φλαβονολών και οιστραδιόλης (E2). Η επίδραση των φλαβονολών μελετήθηκε τόσο στη δραστηριότητα ενδογενών υποδοχέων ER όσο και στη δραστηριότητα εξωγενών υποδοχέων ERα και ERβ. Αρχικά, μελετήθηκαν συγκεντρώσεις των υπό εξέταση φλαβονολών, οι οποίες σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία παρουσιάζουν αντι-καρκινική, αντι-αποπτωτική δράση (5μM-100μM) σε καρκινικά κύτταρα HCT116. Στη συνέχεια, δεδομένης της αποτελεσματικότητας της TAC τόσο σε επίπεδο αποπτωτικής δράσης, όσο και σε επίπεδο ανασταλτικής δράσης υποδοχέων οιστρογόνων, έγινε συγκριτική μελέτη των υπό εξέταση φλαβονολών σε χαμηλές συγκεντρώσεις (5μM), υψηλής όμως αποτελεσματικότητας της TAC.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν πως η TAC παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αναστολή στη δραστηριότητα των ενδογενών υποδοχέων οιστρογόνων και μάλιστα μεγαλύτερη αυτής παρουσία καμφερόλης και κερκετίνης. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι η δράση της TAC φαίνεται να επιτελείται κυρίως μέσω της ERα μορφής του υποδοχέα. Πειράματα συναγωνιστικής αναστολής E2 και TAC αποδεικνύουν επίσης ότι η TAC ασκεί αντι-οιστρογονική δράση. Δεδομένου ότι η βήτα μορφή του υποδοχέα σχετίζεται με αντικαρκινική δράση, σε αντίθεση με την ERα μορφή, τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν τη χρήση της TAC ως ένα εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο, με στοχευμένη δράση έναντι της ERα ισομορφής, για την περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

5ο ΜΕΡΟΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Robert M. Berne, Matthew N. Levy, (2000), Φυσιολογία, Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- Anna-Maria G. Psarra, Constantine E. Sekeris, (2008), Steroid and Thyroid Hormone Receptors in Mitochondria. *Life*, 60(4) : 210-223
- Anna-Maria G. Psarra, Constantine E. Sekeris, (2008), Nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Science Direct*, 1-11
- Δημήτριος Κουρέτας, (2003), Βιοχημική τοξικολογία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας
- Martha Campbell-Thompson, I. Jeanette Lynch, Bhavna Bhardwaj, (2001), Expression of Estrogen Receptor (ER) Subtypes and ER β Isoforms in Colon Cancer. *Cancer Research*, 61, 632–640
- Hirohito Yamaguchi, Kapil Bhalla, Hong-Gang Wang, (2003), Bax Plays a Pivotal Role in Thapsigargin-induced Apoptosis of Human Colon Cancer HCT116 Cells by Controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 Release from Mitochondria. *Cancer Research*, 63, 1483–1489
- Χρήστος Σουλελής, Φλαβονοειδή και συγγενείς ομάδες φυτικών χρωστικών-χημική τους δομή και θεραπευτικές τους ιδιότητες, www.iama.gr/ethno/.../tsai.../Tsai_tou_vounou_Souleles_Xristos.pdf
- Bruneton J., (1995), Pharmacognosy - Phytochemistry Medicinal plants. pp. 265-311, Technique and Documentation - Lavoisier, Paris
- Dey P.M., Harborne J.B., (1989), Methods in Plant Biochemistry Vol. I pp. 197-441, Academic Press. London
- Markham K.R., (1982), Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press London, New York
- Trease G.E., Evans W.C., (1985), Pharmacognosy. ed. 12th, pp. 411-414, Bailliere Tindal, London
- Wijesekera R.O.B., (1991), The Medicine Plant Industry. pp. 115-118, CRC Press, Boca Raton Ann. Arbor Boston, London
- Wei Li , Bingna Dua, Tianyi Wang, Siling Wang, Jinghai Zhanga, (2009), Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer

cells via the Ataxia-Telangiectasia Mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated Modulator of Apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 177, 121–127

- www.pharmacy.upatras.gr/index.php/en/latest-news/doc.../139---
- Lynne M Howells, Robert G Britton, Marco Mazzeletti, Peter Greaves, Massimo Brogini, Karen Brown, William P Steward, Andreas J Gescher, Stewart Sale, (2010), Preclinical Colorectal Cancer Chemopreventive Efficacy and p53-Modulating Activity of 3',4',5'-Trimethoxyflavonol, a Quercetin Analog. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(8): 929–939
- Mei Zhang, Steven G. Swartz, Liangjie Yin, Chaomei Liu, Yeping Tian, Yongbing Cao, Michael Swartz, Shanmin Yang, Steven B. Zhang, Kunzhong Zhang, Shaoqing Ju, David J. Olek, Jr., Lisa Schwartz, Peter C. Keng, Rob Howell, Lurong Zhang, Paul Okunieff, (2011), Antioxidant Properties of Quercetin. *Springer Science+Business Media*, 701, DOI 10.1007/978-1-4419-7756-4_38
- Marion Richter, Robert Ebermann, Brigitte Marian,(1999), Quercetin-Induced Apoptosis in Colorectal Tumor Cells: Possible Role of EGF Receptor Signaling. *Nutrition and Cancer*, 34(1), 88-99
- Rory Kennelly, Dara O Kavanagh, Aisling M Hogan, Desmond C Winter, (2008), Oestrogen and the colon: potential mechanisms for cancer prevention. *Lancet Oncol*, 9: 385–91
- Filippo Acconcia, Maria Marino, (2011), The effects of 17 β -estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane. Volume 2, Article 30
- Chithan Kanadaswami, Lung-Ta Lee, Ping-Ping H Lee, Jiuan-Jiuan Hwang, Ferng-Chun Ke, Ying-Tung Huang and Ming-Ting Lee, (2005), The Antitumor Activities of Flavonoids. *In vivo* 19: 895-910
- J.Q. Chen, M. Delannoy, C. Cooke, J.D. Yager, (2004), Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 286: E101-E102
- S.H. Yang, R. Liu, E.J. Perez, Y. Wen, S.M. Stevens Jr., T. Valencia, A.M. Brun-Zinkernagel, L.Prokai, Y.Will, J. Dykens, P.Koulen, J.W.

- Simpkins, (2004), Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 4130-4135
- J.Q. Chen, J.D. Yager, J. Russo, (2005), Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim. Biophys. Acta*, 1746: 1-17
 - J.D. Yager, J.Q. Chen, (2007), Mitochondrial estrogen receptors-new insights into specific functions. *Trends Endocrinol. Metab.*, 18: 89-90
 - Y.C. Hsieh, H.P. Yu, T. Suzuki, M.A. Choudhry, M.G. Schwacha, K.I. Bland, I.H. Chaudry, (2006), Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 41: 511-521
 - Y.C. Hsieh, M.A. Choudhry, H.P. Yu, T. Shimizu, S. Yang, T. Suzuki, J. Chen, K.I. Bland, I.H. Chaudry, (2006), Inhibition of cardiac PGC-1alpha abolishes ERbeta agonist-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. *FAESB J.*, 20: 1109-1117
 - C. Stirone, S.P. Duckles, D.N. Krause, V. Procaccio, (2005), Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol. Pharmacol.*, 68: 959-965
 - S.P. Duckles, D.N. Krause, C. Stirone, V. Procaccio, (2006), Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol. Interv.*, 6: 26-35
 - A. Lu, M. Frink, M.A. Choudhry, W.J. Hubbard, L.W. 3rd Rue, K.I. Bland, I.H. Chaudry, (2007), Mitochondria play an important role in 17beta-estradiol attenuation of H₂O₂-induced rat endothelial cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 292: E585-E593
 - R. O' Lone, K. Knorr, I.Z. Jaffe, M.E. Schaffer, P.G. Martini, R.H. Karas, J. Bienkowska, M.E. Mendelsohn, U. Hansen, (2007), Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol. Endocrinol.*, 21: 1281-1296

- A. Pedram, M. Razandi, D.C. Wallace, E.R. Levin (2006), Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol. Biol. Cell*, 17: 2125-2137
- M. Razandi, A. Pedram, I. Merchenthaler, G.L. Greene, E.R. Levin, (2004), Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol*, 18: 2854–2865
- T.C. Pappas, B. Gametchu, C.S. Watson, (1995), Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J*, 9: 404–410
- A. Pedram, M. Razandi, E.R. Levin, (2006), Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol*, 20: 1996–2009
- M. Razandi, P. Oh, A. Pedram, J. Schnitzer, E.R. Levin, (2002), ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocrinol.*, 16: 100–115
- G. Fiorelli, L. Picariello, V. Martineti, F. Tonelli, M.L. Brandi, (1999), Functional estrogen receptor beta in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261: 521–527
- F. Caiazza, P. Galluzzo, S. Lorenzetti, M. Marino, (2007), 17beta-Estradiol induces ERbeta up-regulation via p38/MAPK activation in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 359: 102–107
- P. Galluzzo, F. Caiazza, S. Moreno, M. Marino, (2007), Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr. Relat. Cancer*, 14: 153–167
- C.M. Doolan, B.J. Harvey, (2003), A G α protein-coupled membrane receptor, distinct from the classical oestrogen receptor, transduces rapid effects of oestradiol on [Ca²⁺]_i in female rat distal colon. *Mol. Cell Endocrinol.*, 199: 87–103
- C.M. Doolan, S.B. Condliffe, B.J. Harvey, (2000), Rapid non-genomic activation of cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase activity and [Ca²⁺]_i by 17beta-oestradiol in female rat distal colon. *Br. J. Pharmacol.*, 129: 1375–1386

- E.J. Filardo, J.A. Quinn, K.I. Bland, A.R. Jr. Frackelton, (2000), Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.*, 14: 1649–1660
- A. Vivacqua, D. Bonofiglio, L. Albanito, et al., (2006) 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol. Pharmacol.*, 70: 1414–1423
- L.A. Ries, P.A. Wingo, D.S. Miller, H.L. Howe, H.K. Weir, H.M. Rosenberg, S.W. Vernon, K. Cronin, B.K. Edwards, (2000), The annual report to the nation on the status of cancer. 1973–1997 *Cancer (Phila.)*, 88: 2398–2424
- J.J. DeCosse, S.S. Ngoi, J.S. Jacobson, W.J. Cennerazzo, (1993), Gender and colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2: 105–115
- F. Levi, C. La Vecchia, L. Randimbison, V.C. Te, S. Franceschi, (1991), Patterns of large bowel cancer by subsite, age, sex, and marital status. *Tumori*, 77: 246–251
- N.J. Froggatt, J. Green, C. Brassett, D.G.R. Evans, D.T. Bishop, R. Kolodner, E.R. Maher, (1999), A common MSH2 mutation in English and North American HNPCC families: origin, phenotypic expression, and sex specific differences in colorectal cancer. *J. Med. Genet.*, 36: 97–102
- A.M. Carothers, M.J. Weyant, N.N. Mahmoud, R.T. Bilinshi, M.M. Bertagnolli, (1999), Estrogen modulates intestinal tumorigenesis in vitro and in vivo. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 59: A371
- C.J. Crandall, (1999), Estrogen replacement therapy and colon cancer: a clinical review. *J. Womens Health Gend. Based Med.*, 8: 1155–1166
- M.J. Chen, M.P. Longnecker, H. Morgenstern, E.R. Lee, H.D. Frankl, R.W. Haile, (1998), Recent use of hormone replacement therapy and the prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol., Biomark. Prev.*, 7: 227–230

- J.D. Potter, R.M. Bostick, G.A. Grandits, L. Fosdick, P. Elmer, J. Wood, P. Grambsch, T.A. Louis, (1996), Hormone replacement therapy is associated with lower risk of adenomatous polyps of the large bowel: the Minnesota Cancer Prevention Research Unit Case-Control Study. *Cancer Epidemiol., Biomark Prev.*, 5: 779–784
- N.A. Hebert-Croteau, (1998), A meta-analysis of hormone replacement therapy and colon cancer in women. *Cancer Epidemiol., Biomark. Prev.*, 7: 653–659
- S. Franceschi, C. La Vecchia, (1998) Colorectal cancer and hormone replacement therapy: an unexpected finding. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 427–438
- P. Pace, J. Taylor, S. Suntharalingam, R.C. Coombes, S. Ali, (1997), Human estrogen receptor β binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor α . *J. Biol. Chem.*, 272: 25832–25838
- G. Bohe, L.B. Sansbury, P.S. Albert, A.J. Cross, L. Kahle, J. Ashby, M.L. Slattery, B. Caan, E. Paskett, F. Iber, J.W. Kikendall, P. Lance, C. Daston, J.R. Marshall, A. Schatzkin, E. Lanza, (2008), Dietary flavonoids and colorectal adenoma recurrence in the polyp prevention trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17: 1344–1353
- T. Yoshida, M. Konishi, M. Horinaka, T. Yasuda, A.E. Goda, H. Taniguchi, K. Yano, M. Wakada, T. Sakai, (2008), Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 375: 129–133
- Y. Nakamura, C.C. Chang, T. Mori, K. Sato, K. Ohtsuki, B.L. Upham, J.E. Trosko, (2005), Augmentation of differentiation and gap junction function by kaempferol in partially differentiated colon cancer cells, *Carcinogenesis* 26: 665–671
- N.H. Nam, (2006), Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Med. Chem.*, 6: 945-951
- S. Teixeira, (2002), Bioflavonoids: proanthocyanidins and quercetin and their potential roles in treating musculoskeletal conditions. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, 32(7): 357-363

- V. García-Mediavilla, I. Crespo, P.S. Collado, (2007), The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 557(2-3): 221-229
- C. Tsimplouli, C. Demetzos, M. Hadzopoulou-Cladaras, P. Pantazis, K. Dimas, (2011), In vitro activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines. *Eur J Nutr.*, DOI 10.1007/s00394-011-0204-5
- Ι.Γ. Γεωργάτσος, Θ.Γ. Γιαννακούρου, (2005), Έλεγχος του μεταβολισμού στο μοριακό επίπεδο, Εκδόσεις Γιανναχούδη
- A. Vander, D. Luciano, M. Τσακόπουλος, J. Sherman, (2001), Φυσιολογία του ανθρώπου Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού, Τόμος Ι, Εκδόσεις Πασχαλίδη
- Naoya Arai, Anders Ström, Joseph J. Rafter, Jan-Åke Gustafsson, (2000), Estrogen Receptor β mRNA in Colon Cancer Cells: Growth Effects of Estrogen and Genistein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270, 425–431
- X. Xu, M. L. Thomas (1994), Estrogen receptor-mediated direct stimulation of colon cancer cell growth in vitro. *Mol. Cell, Endocrinol.*, 105, 197–201
- M. D. Domenico, G. Castoria, A. Bilancio, A., Migliaccio, F. Auricchio, (1996), Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res.*, 56, 4516–4521